

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce:

Významné proteiny klíšťat jako inspirace pro biomedicínu



Vypracovala: Zuzana Radičová
Školitel: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.
Školitel specialista: Mgr. Tereza Chrudimská

České Budějovice
2011

Bakalářská práce:

Radičová Z., 2011: Významné proteiny klíšťat jako inspirace pro biomedicínu

[Important proteins of tick as inspiration for biomedicin. Bc. Thesis, in Czech.] – 70p,

Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotation:

Ticks are common ectoparasites of vertebrates spread world-wide. They are the vectors of many pathogens causing medically important diseases of men and animals. For this reason, tick are often used as model organisms. Many researchers focused on identification of chemical substances responsible for tick survival. This thesis, targets the tick proteins that could have become candidates for anti-tick vaccine development or play another important role in biomedicine.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. 4. 2011

.....
Zuzana Radičová

Především bych velice ráda poděkovala svému školiteli panu profesoru Liboru Grubhofferovi a Terezce Chrudimské za možnost pracovat na takto zajímavém tématu a za nikdy nekončící trpělivost a laskavost. Největší díky patří mému manželovi Martinovi a mé mamince, kteří mi vždy věřili a bezvýhradně mě podporovali v mé práci.

Děkuji Vám

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1 Klíšťata	2
1.2 Interakce klíšťe-hostitel	2
1.2.1 Hemostáza hostitele	3
1.2.2 Imunitní odpověď	4
1.3 Interakce klíšťe-patogen	5
1.4 Příjem potravy a trávení klíšťe	6
1.4.1 Slinné žlázy klíšťat (<i>Ixodidae</i>) a koxální žlázy klíšťáků (<i>Argasidae</i>)	7
1.4.2 Střevo klíšťe (mesenteron)	8
2. „VÝSLEDKY“ – IDENTIFIKOVANÉ PROTEINY KLÍŠŤAT	9
2.1 Imunomodulační látky	9
2.2 Antihemostatické proteiny	17
2.2.1 Inhibitory agregace krevních destiček	17
2.2.2 Proteiny inhibující koagulaci	20
2.2.3 Proteiny inhibující koagulaci i agregaci krevních destiček	24
2.3. Proteiny s antimikrobiální aktivitou	24
2.5 Proteázy, inhibitory proteáz a některé další enzymy	28
2.5.1 Cysteinové proteázy	28
2.5.2 Aspartátové peptidázy	31
2.5.3 Serinové proteázy a jejich inhibitory	31
2.5.4 Metaloproteázy	32
2.5.5 Aminopeptidázy	33
2.6 Některé další molekuly klíšťat	34
3. DISKUZE	36

3.1 Využití klíčících proteinů	36
3.1.1 Protiklíšící vakcíny	36
3.1.2 Medicínsky významné klíšící molekuly	37
4. ZÁVĚR	39
5. POUŽITÉ ZKRATKY	40
6. SEZNAM LITERATURY	44

1. ÚVOD

Klíšťata, jakožto přenašeči mnoha velmi nebezpečných nemocí lidí i zvířat, se staly cílem výzkumných týmů po celém světě. Ty si daly za úkol objasnit procesy v těle klíšťat, které jim zajišťují takovou úspěšnost při přežití, a identifikovat zúčastněné molekuly.

V posledních letech se podařilo identifikovat stovky molekul proteinů, které se ukazují jako možné cíle pro využití ve farmacii, ale také jako kandidáti vakcíny proti klíšťatům. K nejvíce prozkoumaným skupinám patří imunomodulační proteiny slinných žláz klíštěte, které umožňují sání krve hostitele, aniž by došlo k imunitní reakci na sání klíštěte, látky s antihemostatickými účinky, které působí proti vytvoření krevní zátky v místě sání, a v neposlední řadě i látky antimikrobiální, které chrání klíště před nákazou mnoha patogeny, kterým jsou jako krevsající ektoparazitě vystaveni. V poslední době se výzkum zaměřuje i na mechanismus trávení klíštěte a na to, jak klíště dokáže zpracovat tak velké množství přijaté krve včetně železa.

Porozumění mechanismům působení těchto již objevených proteinů a identifikace velkého množství dalších dosud nepoznaných proteinů, skýtá v sobě naději účinných vakcín proti klíšťatům i jimi přenášeným patogenům.

1.1 Klíšťata

Klíšťata jsou celosvětově rozšíření ektoparazité suchozemských obratlovců, kteří přenášejí řadu nebezpečných původců onemocnění lidí i zvířat (virus klíšťové encefalidity, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophylum*, *Theileria parva*, *Babesia sp.*, *Ehrlichia sp.* a další), (Bowman et al., 2008).

Klíšťata *Ixodida* (*Arthropoda*, *Arachnida*, *Acari*) se dělí na čeledi *Ixodidae* („tvrdá klíšťata“ → klíšťata), *Argasidae* („měkká klíšťata“ → klíšťáci) a *Nuttallidae*. Nejpočetnější je čeleď *Ixodidae*, jež čítá 12 rodů zastoupených 720 druhy, dále pak čeleď *Argasidae* s 4 rody čítajícími 186 druhů. Čeleď *Nuttallidae* je zastoupena jedním druhem, celkově je velmi málo prozkoumána, a proto již nebude dále uváděna (Bowman et al., 2008). Zástupci jednotlivých čeledí *Ixodida* se liší ekologií, životním cyklem a spektrem patogenů, které jsou schopni přenášet (Sonenshine, 1993).

Klíšťata z čeledi *Ixodidae* prodělávají během svého života čtyři vývojová stádia – stádium vajíčka, larvy, nymfy, dospělce, jsou tedy většinou tříhostitelské a řadíme je k pomalu sajícím klíšťatům. Naproti tomu klíšťáci (*Argasidae*) mohou mimo stadia vajíčka, larvy, nymfy a dospělce procházet navíc několika nymfálními stadii (instary), pokud nemají možnost se dostatečně nasát, aby prodělali přeměnu do dalšího stádia. Cyklus sání uzpůsobují chování hostitele a proto je označujeme jako rychle sající klíšťata (Oliver et al., 1989).

1.2 Interakce klíšťe-hostitel

První kontakt klíšťe a hostitele představuje přichycení klíšťe na tělní pokryv hostitele. Poté klíšťe pomocí chelicer pronikne hypostomem do kůže hostitele, čímž naruší anatomickou bariéru, tvořenou epidermis, dermálními buňkami, a poškodí některé lokální cévky. Následné sání klíšťe pak vyvolá silnou odpověď hostitele v podobě hemostázy a

imunitní odpovědi, jimž se klíště brání sekrecí biologicky aktivních látek ze slinných žláz (Wang et Nuttal, 1994, Andrade et al., 2005, Steen et al., 2006).

1.2.1 Hemostáza hostitele

Hemostáza je velmi složitý a účinný systém, který má za úkol zabránit ztrátám krve. Mechanismy tvořící tento systém jsou agregace krevních destiček, vazokonstrikce a koagulační kaskáda (Ribeiro 1987, Ribeiro 1995).

První mechanismus nastupující při poranění tkáně hostitele, jenž má zabránit ztrátám krve, je agregace krevních destiček. Trombocyty mohou být aktivovány různými stimuly jako jsou kolagen, trombin, tromboxan A₂ a ADP (adenosindiphosphate). Poté co dojde k jejich aktivaci, změní se povrch krevních destiček, což vede k jejich agregaci. Během těchto dějů dochází k sekreci farmakoaktivních látek, které mají za následek vazokonstrikci a tvorbu krevní zátky z trombocytů (Andrade et al., 2005).

Koagulační kaskáda je dalším mechanismem sloužícím zabránění ztráty krve. Může být spuštěna buď kolagenem (vnitřní cesta) nebo tkáňovým faktorem (vnější cesta). Jejím výsledkem je přeměna faktoru X na aktivní faktor Xa, což má za následek změnu protrombinu na aktivní trombin, který štěpí fibrinogen na fibrin. Fibrin polymerizuje a tvoří krevní sraženinu, která zpevňuje zátku tvořenou krevními destičkami (Andrade et al., 2005).

Klíšťata se hemostáze hostitele brání produkcí mnoha molekul, které mají schopnost inhibovat agregaci krevních destiček, a to buď navázáním se na receptory pro aktivační proteiny trombocytů nebo receptory pro vazbu na fibrinogen. Některé mohou dokonce rozpojit již vzniklé agregáty (Ribeiro et al., 1985, Waxman et Connolly, 1993, Karczewski et al., 1994).

Při inhibici koagulační kaskády se aktivita klíštěcích molekul zaměřuje například na inhibici trombinu, faktoru Xa a inhibici komplexu faktor VIIa/TF (tissue factor), (van de Loch et al.,

1996, Leboulle et al., 2002, Francischetti et al., 2002). Nezbytným krokem při inhibici hemostázy je potlačení vazokonstrikce, ke které dochází prostřednictvím prostaglandinu E₂ (PGE₂) a prostaglandinu F₂ (PGF₂), (Dickinson et al., 1976, Ribeiro et al., 1985).

1.2.2 Imunitní odpověď

Na narušení anatomické bariéry klíštětem odpovídá hostitel jak nespecifickou tak specifickou imunitní odpovědí. Nejrychleji se vyvíjí nespecifická imunitní odpověď hostitele (zánět), která zahrnuje komplement, žírné a dendritické buňky, makrofágy, NK (natural killer) buňky, granulocyty a proteiny akutní fáze. Při opakovaném sání se začne vyvíjet specifická imunitní odpověď, zahrnující T a B lymfocyty včetně paměťových buněk, které umožňují při jejich opětovném vystavení klíštěčím antigenům během sání rychlejší reakci (Andrade et al., 2005).

Události vedoucí k aktivaci komplementu jsou založeny na enzymatické kaskádě, která je podobná koagulační kaskádě a zahrnuje molekuly/proteiny označované C1 - C9 (Andrade et al., 2005). Fragmenty komplementu C3a, C4a a C5a aktivují žírné buňky, které zvyšují množství histaminu, cytokinů a jiných prozánětlivých látek. C5a se chová také jako silný chemoatraktant pro neutrofile. Součástí komplementu C5b, C6, C7, C8 a C9 tvoří následně membránu invadující komplex. Proteiny akutní fáze (např. C reaktivní protein, S reaktivní protein, fibrinogen) zvyšují odolnost hostitele k infekcím a podporují opravu poškozené tkáně (Delves et Roitt, 2000). Žírné buňky obsahující histamin a serotonin nesou vysoce reaktivní receptor pro IgE protilátky. Po aktivaci produkují zvýšené množství metabolitů kyseliny arachnidové a různých cytokinů včetně IL (interleukin)-4 a TNF (tumor necrosis factor)- α , které stimulují imunitní odpověď směrem k Th2 cytokinovému profilu nebo k protilátkám zprostředkované imunitní odpovědi. Žírné buňky jsou též zodpovědné za

produkci bradykinu, serotoninu a histaminu, tedy látek zodpovědných za bolest a svědění v místě přisání klíštěte (Boyce, 2004).

Slinné žlázy klíštěte obsahují imunogeny, které jsou pomocí Langerhansových buněk a dalších antigen prezentujících buněk (APC) vystaveny působení B-lymfocytů v lymfatických uzlinách. Výsledkem jejich interakce je produkce protilátek – nejprve třídy IgM a IgE, poté IgG, a vznik paměťových buněk (Schoeler et Wikel, 2001). Pokud dochází opakovaně k vystavení sání klíštětem, vzniká bazofilní DTH (delayed-type hypersensitivity) reakce, která se projevuje urychlenou tvorbou protilátek v místě sání klíštěte (Wikel, 1982). Tato reakce je spojena s aktivací Th1 lymfocytů, produkcí interferonu (INF)- γ , IL-2 a IL-12 a degranulací bazofilů a eozinofilů (Mosmann et al., 1989).

Pro zajištění úspěšného příjmu potravy a tudíž i možnosti dokončit svůj životní cyklus, si klíšťata musela vyvinout mnohé mechanismy, jak tlumit hostitelovu imunitní odpověď. Bylo mnohokrát popsáno, že sliny klíštěte (či extrakty slinných žláz) obsahují velké množství farmako-aktivních molekul umožňujících například inhibici komplementu či funkční modulaci hostitelské sítě cytokinů/chemokinů (Wikel, 1996, Kovář et al., 2002, Pechová et al., 2004).

1.3 Interakce klíště-patogen

Příjem potravy – krve, je u hematofágních členovců spojen s rizikem současného příjmu patogenních mikroorganismů z těla hostitele. Některé z nich jsou úspěšně potlačeny imunitní reakcí příjemce (nekompatibilní vektor), jiné mají schopnost odolat imunitním reakcím a být následně během dalšího sání krve přeneseny na dalšího hostitele (kompatibilní vektor).

Klíšťata jakožto bezobratlí živočichové disponují pouze tzv. přirozenou imunitou (innate immunity). Ta zahrnuje složku buněčnou i humorální, které vzájemně spolupracují.

Buněčnou složku imunity klíšťat představují hemocyty, jež se liší strukturou, funkcí i počtem typů dle druhu klíštěte (Borovičková et Hypša, 2005). Hlavními funkcemi hemocytů jsou fagocytóza, nodulace a enkapsulace. Složky humorální imunity mají za úkol rozpoznat povrchové molekuly patogenních organismů a označit (opsonizovat) je pro hemocyty. Zároveň některé molekuly zastoupené v humorální odpovědi mají antimikrobiální aktivitu a mohou přímo usmrtit přítomné infekční organismy (Taylor et al., 2006).

Při přenosu některých infekčních agens byl pozorován neznámý efekt faktoru SAT (saliva activated transmission), při kterém patogeny účinně využívají imunomodulačních schopností proteinů klíštěcích slin pro úspěšný přenos do těla hostitele. Tento jev byl poprvé pozorován při přenosu arboviru Thogoto (Jones et al., 1989). SAT efekt byl zaznamenán rovněž při přenosu viru klíšťové encefalitidy (Labuda et al., 1993), bakterie *A. phagocytophylum* (Ogden et al., 2002), spirochét lymské boreliózy (Pechova et al., 2002, Zeidner et al., 2002) či bakterie *Franciscella tularensis* (Krocova et al., 2003). První protein spojený s tímto fenoménem byl objeven v roce 2002 u klíštěte *Ixodes scapularis*, byl nazván SALP 15 (salivary gland protein) a usnadňoval přenos bakterie *B. burgdorferi* na hostitele (Anguita et al., 2002, Ramamoorthi et al., 2005). U dalšího proteinu SALP16 z *I. scapularis* byl pozorován SAT-efekt při přenosu *A. phagocytophylum* (Das et al., 2000, Sukumaran et al., 2006).

1.4 Příjem potravy a trávení klíštěte

Příjem a trávení potravy – krve – je u klíštěte zásadní pro jeho další vývoj, přežití a rozmnožování.

Proces sání se liší mezi klíšťáky *Argasidae* a klíšťaty *Ixodidae*. U pomalu sajících klíšťat (*Ixodidae*) se vystřídají během celého procesu sání tři fáze. První je přípravná fáze, která trvá 24-36 hodin a při které klíště upevňuje své přichycení na hostiteli. Následuje fáze pomalého sání, která může trvat i několik dní, kdy klíště začíná přijímat potravu a

trávit ji. Poslední fáze je fáze rychlého saní, která trvá 12-36 hodin a klíště při ní přijme ohromné množství potravy, které mu umožní přeměnu do dalšího stadia, nebo v případě samic vykladení vajíček. Klíšťáci (*Argasidae*) jsou rychle sající klíšťata, která sají od několika minut po několik hodin a poté odpadají.

Trávení klíšťat narušilo od ostatních živočichů probíhá intracelulárně, tedy uvnitř buněk střevního epitelu (Sonenshine et al., 1991). Poslední výzkumy, které vedly k identifikaci proteáz účastnících se trávení u klíšťat, ukázaly, že jejich trávicí systém připomíná spíše situaci u krevsajících motolic (Caffrey et al., 2004).

1.4.1 Slinné žlázy klíšťat (*Ixodidae*) a koxální žlázy klíšťáků (*Argasidae*)

Mezi největší žlázy v těle klíštěte řadíme slinné (koxální) žlázy, které jsou nezbytné při procesu sání a příjmu krve, ale i pro přenos patogenů.

U klíšťat z čeledi *Ixodidae* jsou slinné žlázy párové, hroznovité svazky žlázek ležící anterolaterálně na obou stranách hemocoelu. Skládají se ze čtyř typů acinů u samečků a tří typů u samic. Aciny I., nazývané agranulární, nemění během příjmu potravy svoji velikost ani strukturu. V současné době převládá názor, že jsou aciny I. využívány pro sekreci hyperosmotické tekutiny, která má za úkol „vychytávat“ vodu z okolního prostředí u nenasátých klíšťat. Aciny II. a III. si jsou velmi podobné, jsou označovány jako granulární či sekreční a během sání mění svůj objem. Bylo zjištěno, že aciny III. typu během sání vylučují zpět do hostitelova těla přebytek vody přijaté krví a tím zároveň zahušťují přijatou krev. Aciny IV. byly nalezeny u samečků a hrají roli převážně při reprodukci. Byly v nich nalezeny i specifické proteiny IgGBP (imunoglobulin G binding proteins), které mají schopnost vychytávat hostitelské protilátky typu IgG a vracet je zpět do těla hostitele.

Koxální žlázy klíšťáků (*Argasidae*), které ústí na bázi končetin, jsou naopak tvořeny pouze dvěma typy acinů, značenými písmeny A a B. Aciny typu A jsou agranulární a

připomínají aciny I. u klíšťat z čeledi *Ixodidae*. Typ B je granulární a během sání vylučuje bioaktivní molekuly (shrnutí Bowman et al., 2008).

1.4.2 Střevo klíštěte (mesenteron)

Mesenteron je morfologicky velmi členitý orgán, skládající se z centrální oblasti nazývané žaludek a sedmi párů slepých tubulárních výběžků. Přes svoji morfologickou různorodost je střevo po histologické stránce jednotné. Stěnu střeva tvoří vrstva epitelálních buněk, které nasedají na bazální laminu, na jejíž vnější stranu je připojena síť svalů. Ve střevě jsou i mimo již diferenciované střevní buňky obsaženy i buňky rezervní, které se podle potřeby mění na buňky s trávicí i sekreční funkcí (Sonenshine, 1991, Agyei, 1992).

2. „VÝSLEDKY“ – IDENTIFIKOVANÉ PROTEINY KLÍŠŤAT

2.1 Imunomodulační látky

Mezi nejvýznamnějšími molekulami klíšťat se schopností potlačit imunitní odpověď hostitele během sání je rodina proteinů SALP 15. Zástupci této rodiny mají molekulovou hmotnost 15 kDa a byly nalezeny u mnoha druhů klíšťat. Protein SALP 15 byl poprvé popsán u klíštěte *I. scapularis* (Anguita et al., 2002), následně byly homology tohoto genu nalezeny i u dalších klíšťat: *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pacificus* (Hovius et al., 2007, Hojgaard et al., 2009). U klíštěte *I. ricinus* byly nalezeny tři isoformy genu pro protein SALP 15, z nichž první vykazuje 80% a další dva 60% podobnost s proteinem SALP 15 u klíštěte *I. scapularis* (Hovius et al., 2007). SALP 15 *I. persulcatus* se vyskytuje ve dvou homolozích nazývaných Iper-1 a Iper-2, které vykazují 51,8% a 62,8 % podobnost s genem pro SALP 15 *I. scapularis* (Mori et al., 2009).

Protein SALP 15 z klíštěte *I. scapularis* má schopnost potlačit aktivaci a proliferaci CD4⁺ T-buněk (Anguita et al., 2002). Váže se na TCR (T-cell receptor), čímž brání vstupu Ca²⁺ iontů do buněk a tím inhibuje produkci IL-2. Molekulární mechanismus této inhibice spočívá v interakci SALP 15 s CD4 komponentou TCR receptorového komplexu, což má za následek zabránění aktivace Lck proteinů z rodiny Src kináz. Vazba proteinu SALP 15 na CD4⁺ buňky má také za následek inhibici aktivace hydrolázy PLCy1, snížení vstupu Ca²⁺ iontů a následnou sníženou produkci IL-2 (Garg et al., 2006; Juncadella et al., 2007).

U proteinu SALP 15 *I. scapularis* byla prokázána jeho interakce s lidskými dendritickými buňkami. Za jeho přítomnosti dochází ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů vyvolané aktivací TLR (toll-like receptor) a též potlačuje dendritickými buňkami vyvolanou aktivaci T-lymfocytů (Hovius et al., 2008).

Protein SALP 15 byl první identifikovanou molekulou klíštěcích slin způsobující SAT-efekt, klíštětem zprostředkovaný přenos patogenů (Jones et al., 1992). Bylo prokázáno, že SALP 15 je využíván spirochétami *B. burgdorferi sensu lato* k usnadnění přenosu do hostitele. Samotná přítomnost borelií v organismu klíštěte zvyšuje expresi proteinu SALP 15 ve slinných žlázách. Ten se zde váže na povrchový protein OspC spirochét *B. burgdorferi* a zajišťuje patogenu ochranu před protilátkami zprostředkovanou imunitou hostitele *in vivo* i *in vitro*. Bylo též pozorováno, že homologní proteiny k SALP15 identifikované u *I. ricinus* (Iric-1) a *I. scapularis* (Iscap) inhibují navázání složek komplementu C5b-C9 na povrch spirochét *B. burgdorferi* jinak citlivých k účinkům komplementu (Schuijt et al., 2008). Pomocí RNA (ribonucleic acid) interference bylo dokázáno, že protein SALP 15 zvyšuje šanci borelií přežít v místě sání klíštěte a usnadňuje tak jejich přenos na hostitele (a to jak na hostitele naivní, tak i na ty, kteří se již s infekcí *B. burgdorferi* setkali), (Ramamoorthi et al., 2005).

Proteiny slin se schopností vázat imunoglobuliny jsou předpokládánou prvotní ochranou klíšťat před přijatými hostitelovými protilátkami (Wang et Nutall, 1999). U klíšťat *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum*, *Ixodes hexagonus* a *I. ricinus* byly identifikovány imunoglobulin G vázající proteiny o molekulové hmotnosti 27 kDa. K navázání IgG na IgGBP dochází v hemocoelu, kam se imunoglobuliny dostávají z nasáté krve ze střeva. Po jejich navázání na IgGBP jsou transportovány do slinných žláz a následně jsou spolu se slinami vyloučeny zpět do těla hostitele (Wang et al., 1995, 1999).

Interleukiny (např. IL-2, IL-4, IL-8, IL-10), hrají důležitou roli při regulaci imunitní odpovědi proti klíštěti. Interleukin-2 vázající protein (IL-2 BP), identifikovaný u klíštěte *I. scapularis*, je zodpovědný za inhibici proliferace T-buněk. Možný mechanismus, při kterém dochází k inhibici T-buněk, byl popsán u klíštěte *I. scapularis* a demonstrován na myších T-buňkách za využití mitogenů ConA (concanvalin A), PHA (phytohemagglutinin) a anti-CD3, které způsobují jejich proliferaci. Mimo jiné bylo pozorováno, že v přítomnosti IL-2 BP

dochází také k inhibici proliferace IL-2 závislých buněčných linií a potlačení funkce buněk, které na svůj povrch exprimují receptor pro IL-2 (Gillespie et al., 2001).

Další proteiny se schopností vázat cytokiny jsou CHPBs (chemokine binding proteins), které, jak z názvu vyplývá, váží chemotaktické cytokiny. Bylo identifikováno několik genů kódující CHPBs, které byly nazvány Evasiny. Jeden z identifikovaných zástupců, o molekulové hmotnosti 10,4 kDa, pojmenovaný jako Evasin 1, byl poprvé identifikován u klíštěte *Rhipicephalus sanguineus*. Bylo zjištěno, že Evasin 1 vykazuje vysokou specifitu pro podskupinu chemokinů, v nichž první dva cysteiny přímo sousedí (CC chemokiny) a je vysoce selektivní pro CCL3, CCL4 a CCL18 a vykazuje značné redukční účinky zánětu v pokožce. Další z identifikovaných proteinů se nazývá Evasin 3, je velký 7 kDa, váže se na CXCL1 a CXCL8 a je možným inhibítozem zánětu zprostředkovaného neutrofyly. Posledním z identifikovaných proteinů této rodiny je Evasin 4 (molekulová hmotnost 12 kDa), který je specifický pro CCL5 a CCL11. U dalších klíšťat nebyly dosud nalezeny žádné homology těchto proteinů (Frauensuh et al., 2007, Déruaz et al., 2008).

Schopnost potlačit složky komplementu je další důležitou funkcí molekul obsažených ve slinách klíšťat (Lawrie et al., 1999). U klíštěte *I. scapularis* byl objeven protein Isac (*Ixodes scapularis* anticomplement). Tento 18,5 kDa velký protein byl připraven jako rekombinant v COS buňkách. Jeho aktivita se shodovala s nálezy aktivity ve slinných žlázách klíštěte, potlačuje lýzi králičích erytrocytů lidským sérem za přítomnosti Mg^{2+} a EGTA (ethylene glycol acetic acid) urychlením odpojení faktoru Bb z C3 konvertázy generované alternativní cestou. Rekombinantní forma Isac nemá vliv na rekalciфикаční čas v plazmě chudé na trombocyty či na aktivaci klasické cesty komplementu. Ukazuje se, že je Isac specifickým inhibítozem aktivace alternativní cesty komplementu, stejně jako faktor H (Valenzuela et al., 2000). Z transkriptomu slinných žláz klíštěte *I. ricinus* byly izolovány dvě isoformy genu pro proteiny podobné proteinu Isac – pojmenované Irac (*Ixodes ricinus* anticomplement) 1 a Irac

2 s předpokládanou molekulovou hmotností 20,3 a 19,6 kDa. Připravený rekombinantní proteiny Irac1 a Irac2 byly schopny potlačit alternativní cestu aktivace komplementu. Váží se na properdin, což vede k inhibici C3 konvertázy. Dále byly popsány sekvence pro pět dalších proteinů, které jsou více než ze 40% podobné proteinům této rodiny. To naznačuje, že pravděpodobně půjde o velmi rozsáhlou rodinu antikomplementárních proteinů vyskytujících se u mnoha druhů klíšťat (Daix et al., 2007; Couvreur et al., 2008).

Další klíčecí protein s imunomodulačními schopnostmi patřící do rodiny serpinů (serine inhibitor protease) o velikosti 43 kDa byl identifikován u klíštěte *I. ricinus* a nazván IRIS (*Ixodes ricinus* immunosuppressor). Pro zjištění jeho imunomodulačních schopností byly studovány vlastnosti rekombinantního proteinu (rIRIS). Bylo zjištěno že rIRIS potlačuje *in vitro* proliferaci myších Balb/c splenocytů stimulovaných mitogenem ConA. Po stimulaci dalšími mitogeny (PHA a LPS (lipopolysacharid)) dochází k inhibici produkce INF- γ lidskými mononukleárními buňkami periferní krve (PBMC). Prokázalo se, že tento protein inhibuje i produkci IL-6 a IL-8, a navázáním na monocyty či makrofágy i sekreci TNF- α (Leboulle et al., 2002; Prevot et al., 2009).

Jiným proteinem s imunomodulačními schopnostmi je CRT (calreticulin), jež byl poprvé zjištěn ve slinách a slinných žlázách klíštěte *Amblyomma americanum*, poté byl nalezen i u dalších klíšťat *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Dermacentor variabilis*, *Haemaphysalis longicornis*, *I. scapularis* a *R. sanguineus*. Klonování a sekvenováním cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) z klíštěte *R.(B.) microplus* bylo zjištěno, že odpovídající protein má velikost 47,7 kDa. Protein je schopný vázat Ca²⁺ ionty a dále se váže na C1q složku komplementu, čímž inhibuje aktivaci komplementu. Kalretikulín tímto ovlivňuje imunitní odpověď hostitele a zvyšuje šanci přežití a dokončení příjmu potravy klíštěte (Sanders et al., 1998, Ferreira et al., 2002, Kaewhom et al., 2008, Parizi et al., 2009).

Protizánětlivé a imunosupresivní účinky byly zjištěny i u Sialostatinů L a L2, které řadíme k cystatinům a které byly nalezeny u klíštěte *I. scapularis*. Sialostatin L inhibuje papain a lidský katepsin L, což může potlačit aktivaci katepsinu D, a dále inhibuje katepsin C, čímž zabraňuje aktivaci serinové proteázy v granulech mnoha imunitních buněk (cytotoxické T lymfocyty, NK buňky, žírné buňky a neutrofilny), (Kotsyfakis et al., 2006). Dále bylo zjištěno, že přítomností Sialostatinu L je redukována maturace dendritických buněk z C57BL/6 myši po indukci LPS. Sialostatin L přítomný v kultuře inhibuje *in vitro* LPS-indukovanou produkci IL-12 a méně výrazně i produkci TNF- α . V jeho přítomnosti dochází též k tlumení exprese CD80 a CD86 v dendritických buňkách po aktivaci pomocí LPS. Rovněž se ukázalo, že Sialostatin L je hlavní inhibitor katepsinu S. Jeho imunomodulační aktivity pro antigen dependentní proliferaci CD4+ T-lymfocytů byly pozorovány i v podmínkách *in vivo* (Sá-Nunes et al., 2009). Sialostatin L2 inhibuje též papain a lidský katepsin L. Prokázalo se, že je nezbytný pro samotný příjem potravy klíštěte a že pravděpodobně podporuje i přenos spirochét *B. burgdorferi* (Kotsyfakis et al., 2010).

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte/ orgán	Literatura
SALP15	15 kDa	- inhibuje aktivaci a proliferaci CD4+ T-buněk, snižuje produkci IL-2 - snižuje produkci prozánětlivých cytokinů, potlačuje dendritickými buňkami vyvolanou aktivaci T-lymfocytů - Iric1 a Kacap homology SALP15 inhibují navázání složek komplementu C5b-C9 na povrch <i>B. burgdorferi</i> - zodpovědný za SAT-efekt	-všechny druhy klíšťat jejichž sliny navozují SAT-efekt (<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. pacificus</i>)	Anguita et al., 2002, Garg et al., 2006, Hovius et al., 2007, Juncadella et al., 2007, Hovius et al., 2008, Schuijt et al., 2008, Hojgaard et al., 2009, Mori et al., 2009,
SALP16	16,4 kDa	- interaguje s A.	<i>Ixodes spp.</i>	Das et al., 2000,

		<i>phagocytophilum</i> a usnadňuje její přenos z patogena na hostitele		Sukumaran et al., 2006 Foley et al., 2007
SALP20	48 kDa	- rekombinantní protein inhibuje alternativní cestu komplementu navázáním na properdin C3 konvertázy - ochraňuje sérum citlivé druhy borelií před komplementem	<i>I. scapularis</i>	Tyson et al., 2007, 2008
Evasin1	10,4 kDa	- vykazuje vysokou specifitu pro skupinu CC chemokinů a vykazuje redukční účinky zánětu v pokožce	<i>R. sanguineus</i>	Frauenschuh et al., 2007, Déruaz et al., 2008
Evasin3	7 kDa	- váže se na CXCL1 a CXCL8 a je možným inhibítorem neutrofyly zprostředkovaného zánětu	<i>R. sanguineus</i>	Frauenschuh et al., 2007, Déruaz et al., 2008
Evasin4	12 kDa	- specifický pro CCL5 a CCL11	<i>R. sanguineus</i>	Frauenschuh et al., 2007, Déruaz et al., 2008
IL-2 BP		- inhibuje proliferaci T-buněk zprostředkovanou mitogenem - potlačení proliferace IL-2 závislých buněčných linií a inhibice funkce buněk, které na svůj povrch exprimují receptor pro IL- 2	<i>I. scapularis</i>	Gillespie et al., 2001
IGBP	27 kDa	- schopný vázat IgG, chrání před jeho účinkem klíště	<i>R. appendiculatus</i> <i>A. variegatum</i> <i>I. hexagonus</i> <i>I. ricinus</i>	Wang et Nuttall, 1995 a 1999
Ra-HBP1-3 (<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> histamin binding protein)	20-25 kDa	- homologní proteiny vázající histamin, potlačují tak zánětlivou reakci	<i>R. appendiculatus</i>	Paesen et al., 1999
Monotonin a	16,6 kDa	- váží histamin a 5-HT	A.	Mans et al., 2008a

Monomin	15,7 kDa	(5-hydroxytryptamin)	<i>monolakensis</i>	
IRAC I a II	20,3 kDa 19,6 kDa	- inhibuje alternativní cestu komplementu navázání na properdin C3 konvertázy	<i>I. ricinus</i>	Daix et al., 2007, Couvreur et al., 2008
ISAC	18,5 kDa	- inhibuje alternativní cestu komplementu navázáním na properdin C3 konvertázy	<i>I. scapularis</i>	Valenzuela et al., 2000
IRIS	43 kDa	- <i>in vitro</i> potlačuje proliferaci myších Balb/c splenocytů stimulovaných ConA - po stimulaci mitogeny PHA a LPS inhibuje produkci INF- γ lidskými PBMC - inhibuje produkci IL-8, IL-6 a sekreci TNF- γ	<i>I. ricinus</i>	Leboulle et al., 2002, Prevot et al., 2009
IRS-2 (<i>Ixodes ricinus</i> serpin 2)	42,1 kDa	- protizánětlivé účinky	<i>I. ricinus</i>	Kovářová et al., 2010
Kalretikulin	47,7 kDa	- váže Ca ²⁺ ionty a váže se na C1q složku komplementu	<i>A. americanum</i> , <i>B. microplus</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>H. longicornis</i> , <i>I. scapularis</i> a <i>R. sanguineus</i>	Sanders et al., 1998, Ferreira et al., 2002, Kaewhom et al., 2008, Parizi et al., 2009
Sialostatin L	12,5 kDa	- inhibuje papain, lidský katepsin L, katepsin C, katepsin S - potlačuje maturaci dendritických buněk z C57BL/6 myši aktivovaných LPS - redukuje expresi CD80 a CD86 v dendritických buňkách - <i>in vitro</i> ovlivňuje LPS - indukovanou produkci IL-12 a TNF- α produkci	<i>I. scapularis</i>	Kotsyfakis et al., 2006, Sá – Nunes et al., 2009
Sialostatin L2	12,8 kDa	- inhibuje papain , lidský katepsin L - pravděpodobně důležitý pro přenos <i>B.</i>	<i>I. scapularis</i>	Kotsyfakis et al., 2010

		<i>burgdorferi</i>		
BIP (B-cell inhibitory protein)	18 kDa	- inhibuje proliferaci B-buněk	<i>I. ricinus</i>	Hannier et al., 2004
BIF (B-cell inhibitory factor)	13 kDa	- inhibice B-lymfocytů	<i>H. asiaticum</i>	Yu et al., 2006a
p36	36 kDa	- potlačuje proliferaci T-lymfocytů stimulovanou ConA	<i>D. andersoni</i> , <i>H. longicornis</i>	Bergmann et al., 2000, Alarcon-Chaidez et al., 2003 Konnai et al., 2009
Karboxypeptidáza	49,5 kDa	- štěpí bradykin, zabraňuje bolesti a svědění	<i>I. scapularis</i>	Ribeiro et Mather, 1998
IsSMase (<i>I. scapularis</i> sphingomyelin diesterase)	45 kDa	- programuje CD4 T-buňky k produkci IL-4 - posouvá imunitní odpověď směrem od Th2 k Th1	<i>I. scapularis</i>	Alarcon-Chaidez et al., 2009
OMCI (<i>O. moubata</i> komplement inhibitor)	16 kDa	- protein vázající složku C5 a inhibující klasickou i alternativní cestu komplementu	<i>O. moubata</i>	Nunn et al., 2005 Roversi et al., 2007 Hepburn et al., 2007
MIF (macrofage migration inhibitory factor)	12,6 kDa	- inhibuje migraci lidských makrofágů	<i>A. americanum</i> , <i>H. longicornis</i>	Jaworski et al., 2001, Umemyia et al., 2007
Om44	44 kDa	- váže hostitelův P-selektin - asi zabraňuje adhezi leukocytů a krevních destiček na cévní stěnu	<i>O. moubata</i>	García-Varas et al., 2009

Tab I.: Přehled molekul s imunomodulačními schopnostmi (všechny se vyskytují v extraktu slinných žláz)

2.2 Antihemostatické proteiny

2.2.1 Inhibitory agregace krevních destiček

Většina proteinů inhibujících agregaci krevních destiček obsahuje Arg-Gly-Asp (RGD motif). RGD motif slouží k navázání daného proteinu na buněčnou membránu krevní destičky. Přesněji na molekuly integrinů, které slouží jako receptory pro aktivační faktory agregace trombocytů (např. fibrinogen).

Prvním popsaným inhibitorem agregace krevních destiček, který obsahuje RGD motif byl Variabilin z klíštěte *D. variabilis*. Tento 5 kDa velký protein slouží jako antagonist glykoproteinových receptorů II_b-III_a a $\alpha_v\beta_3$ pro fibrinogen a vitronectin (Wang et al., 1996).

Dalším proteinem se schopností potlačit agregaci krevních destiček je Savignigrin, který patří do rodiny BPTI (basic pancreatic trypsin inhibitor) -Kunitzových receptorových proteinů. Jedná se o protein izolovaný z klíštěčka *Ornithodoros savignyi* a vyskytuje se ve čtyřech isoformách A+, A-, B+, B-. Písmenem A a B jsou značeny konformační isoformy Savignigrinu, znaménka +/- označují isoformy, které vznikly jako genetické duplikáty. Molekulová hmotnost + isoformem je 7 kDa a – isoformem je 6,8 kDa. Všechny čtyři isoformy mají schopnost inhibovat agregaci aktivovaných krevních destiček iniciovanou ADP (IC₅₀, 130nM), kolagenem, TRAP (trombin activated protein) či epinefrinem. Mohou též rozpojit trombocyty agregované za pomoci ADP. Savignigriny jsou vysoce specifické pro integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, povrchovou molekulu trombocytů. Navázáním Savignigrinu se zabrání aktivaci $\alpha_{IIb}\beta_3$, který má za úkol zprostředkovat agregaci krevních destiček navázáním na fibrinogen (Mans et al., 2002).

U následujících proteinů se RGD motif nevyskytuje a mechanismus inhibice agregace krevních destiček je proto jiný.

Moubatin, protein z rodiny lipocalinů, byl poprvé izolován z klíšťáka *Ornithodoros moubata* v nativní podobě. Moubatin (17 kDa) má schopnost inhibovat agregaci promytých krevních destiček indukovanou kolagenem standardní cestou ($IC_{50} = 50\text{nM}$) a inhibuje i agregaci krevních destiček v plazmě. Bylo zjištěno, že při vyšších koncentracích Moubatinu ($>1\mu\text{M}$) je možno pozorovat inhibiční efekt na agregaci indukovanou nízkou koncentrací ADP. Moubatin také inhibuje druhou fázi agregace krevních destiček indukovanou ADP o koncentraci $\leq 5\mu\text{M}$. Vliv Moubatinu při adhezi krevních destiček vyvolanou kolagenem je minimální (Waxman et Connolly, 1993). K inhibici agregace dochází navázáním Moubatinu na receptor pro tromboxan A_2 na povrchu krevních destiček, čímž dojde k vyblokování dráhy závislé na cyklooxygenáze (Keller et al., 1993).

Ze slinných žláz klíšťáka *O. moubata* byl izolován protein o velikosti 6 kDa a nazván Disagregin. Ten inhibuje ADP - iniciovanou agregaci krevních destiček v plazmě ($IC_{50}=104 \pm 17\text{ nM}$). Potlačuje také agregaci vyvolanou kolagenem, epinefrinem, aktivačním faktorem krevních destiček, trombinem a peptidovým receptorem pro trombin SFLLRNPNDKYEPF. Agregaci inhibuje navázáním na glykoproteinový receptor krevních destiček II_b-III_a pro fibrinogen, čímž zcela potlačuje adhezi destiček na fibrinogen. Dále bylo prokázáno, že Disagregin částečně inhibuje adhezi destiček na fibronectin a má malý vliv na jejich adhezi na kolagen (Karczewski et al., 1994).

Protein se schopností nejen inhibovat agregaci krevních destiček, ale i se schopností je disagregovat se nazývá Apyráza (ATP (adenosintriphosphate)-difosfohydroláza) a patří do rodiny 5-nukleotidáz. Apyráza patří mezi nejrošřenejší molekuly inhibující agregaci trombocytů u krev sajících členovců (Andrade et al., 2005). Jedná se o protein sekretovaný klíšťaty během sání a poprvé nalezený u klíšťěte *I. scapularis* (Ribeiro et al., 1985). Apyráza byla dále identifikována u klíšťáků *O. moubata*, *O. savignyi* a dalších (Ribeiro et al., 1991, Mans et al., 1998). Apyráza inhibuje ADP a kolagenem indukovanou agregaci krevních

destiček a zapřičiňuje i disagregaci krevních destiček již agregovaných tím, že štěpí ADP a ATP na ADP, AMP (adenosinmonophosphate) a fosfát (Mans et al., 2000). Nedávno byly další isoformy Apyrázy objeveny u klíšťat *R. appendiculatus* a *I. scapularis* (Stutzer et al., 2009).

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte /orgán	Literatura
Apyráza (ATP difosfohydroláza)	24,2 kDa	- enzym blokující agregaci krevních destiček a štěpící již vzniklé agregáty	<i>O. savignyi</i> <i>I. scapularis</i> <i>O. moubata</i> - slinné žlázy	Ribeiro et al., 1985 Ribeiro et al., 1991 Mans et al., 1998 Mans et al., 2000
Disagregin	6 kDa	- protein inhibující ADP, kolagenem, epinefrinem, faktorem aktivace krevních destiček, trombinem a peptidem pro trombinový receptor indukovanou agregaci krevních destiček	<i>O. moubata</i> - slinné žlázy	Karczewski et al., 1994
IRS-2	42,1 kDa	- inhibitor katepsinu G a chymázy - inhibuje agregaci krevních destiček indukovanou katepsinem G a trombinem	<i>I. ricinus</i> - slinné žlázy	Chmelar et al., 2011
Monobin	15 kDa	- protein inhibující trombinem indukovanou agregaci krevních destiček	<i>A. monolakensis</i>	Mans et al., 2008b
Monogrin 1 a 2	9,8 kDa 9,9 kDa	- obě formy proteinu mají schopnost potlačit ADP, epinefrinem a kolagenem indukovanou agregaci krevních destiček, navázáním se na receptor pro	<i>A. monolakensis</i>	Mans et al., 2008b

		fibrinogen II _b III _a		
Moubatin	17 kDa	- inhibitor agregace krevních destiček stimulované kolagenem	<i>O. moubata</i>	Waxman et Connolly, 1993
Savignygrin	7 kDa 6,8 kDa	-protein inhibující agregaci aktivovaných krevních destiček indukovanou ADP, kolagenem, peptidem aktivujícím trombinový receptor a epinefrinem	<i>O. savignyi</i>	Mans et al., 2002
Savignin	12,4 kDa	- inhibitor trombinu - inhibuje agregaci krevních destiček indukovanou trombinem	<i>O. savignyi</i> - slinné žlázy	Nienaber et al., 1999
Variabilin	5 kDa	-protein inhibující agregaci krevních destiček - antagonist receptoru pro fibrinogen II _b III _a vitronectinového receptoru $\alpha_v\beta_3$	<i>D. variabilis</i> - slinné žlázy	Wang et al., 1996

Tab. II.: Přehled molekul inhibujících agregaci krevních destiček (molekuly, u kterých není uveden orgán, byly získány z homogenátu celých klíšťat)

2.2.2 Proteiny inhibující koagulaci

Ixolaris, protein o velikosti 15,7 kDa, byl poprvé identifikován u klíštěte *Ixodes scapularis* (Francischetti et al., 2002). Analýzou jeho cDNA byla zjištěna homologie odpovídajícího proteinu s lidským TFPI (tissue factor pathway inhibitor). Pomocí produkce tohoto proteinu v hmyzím expresním systému bylo zjištěno, že inhibuje faktor VIIa/TF indukovaný faktorem X při IC₅₀ v pikomolárním rozsahu. Bylo zjištěno, že Ixolaris v nedenaturovaném stavu interaguje stochiometricky s faktory Xa a X, nikoli s faktorem VIIa. K inhibici komplexu faktorů VIIa/TF dochází při navázání proteinu Ixolaris buď na jeden ze

zymogenů faktoru X, nebo do aktivního místa enzymu faktoru Xa. Dále bylo prokázáno, že interaguje s faktorem X přes vazebné místo pro heparin (heparin-binding proexosite), a tak inhibuje aktivaci faktoru X vnitřním tenázovým komplexem (Francischetti et al., 2002, Monteiro, 2005).

Dalšími významnými proteiny inhibujícími koagulační kaskádu a zaměřujícími se na klíčový faktor Xa jsou proteiny TAP (tick anticoagulant peptide) a fXaI (factor Xa inhibitor). TAP, nízkomolekulární inhibitor serinových proteáz, byl poprvé získán z extraktu slinných žláz klíšťáka *O. moubata*. Jedná se o specifický inhibitor faktoru Xa o molekulové hmotnosti 6 kDa, který vykazuje homologii s inhibitory Kunitzova typu (Waxman et al., 1990, Antuch et al., 1994).

Inhibitor faktoru Xa (7,2kDa) byl poprvé izolován z extraktu slinných žláz připraveného z klíštěte *O. savignyi*. Jde o vysoce specifický inhibitor faktoru Xa, jehož funkce byla ověřena na rekombinantním proteinu, připraveném expresí v bakulovirovém expresním systému. Rekombinantní protein inhibuje faktor Xa z 91%. Proteiny fXaI a TAP vykazují vzájemnou 78% homologii (Gaspar et al., 1995, Joubert et al., 1998)

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte /orgán	Literatura
Ixolaris	15,7 kDa	- antikoagulační peptid homologní k lidskému TFPI - navázání na oba zymogeny faktoru X a enzym faktoru Xa inhibuje faktor VIIa/TF	<i>I. scapularis</i>	Francischetti et al, 2002
Penthalaris	35 kDa	- antikoagulační peptid unikátní svojí odlišností od TFPI a TFPI podobným molekulám - rekombinantní protein inhibuje faktor VIIa/TF indukovaný aktivací faktoru X s IC ₅₀ ~100nm	<i>I. scapularis</i> <i>I. ricinus</i> - slinné žlázy	Francischetti et al., 2004
IRIS	43 kDa	- antikoagulační protein z rodiny serpinů, jehož	<i>I. ricinus</i>	Leboulle et al., 2002 Prevot et al., 2009

		rekombinantní protein inhibuje trombin a faktor Xa		
TAP	6 kDa	- inhibitor serinových proteáz s antikoagulačními schopnostmi, strukturní homolog k BPTI - vysoce selektivní pro faktor Xa	<i>O. moubata</i>	Waxman et al, 1990 Antuch et al, 1994 Joubert et al, 1998
fXaI	7,2 kDa	- antikoagulační peptid - specifický inhibitor faktor Xa	<i>O. savignyi</i> - slinné žlázy	Gaspar et al., 1996 Joubert et al., 1998
nymfální fXaI	15 kDa	- protein specifický pro faktor Xa s antikoagulačními schopnostmi	<i>H. dromedarii</i> - nymfy	Ibrahim et al., 2001a
SALP14	9,8 kDa	- protein inhibující faktor Xa	<i>I. scapularis</i> - slinné žlázy	Narasimhan et al., 2002
SALP9pac	9,3 kDa	- paralog proteinu SALP14, se schopností inhibovat faktor Xa	nymfy <i>I.</i> <i>scapularis</i>	Narasimhan et al., 2002
Haemaphysalin		- inhibuje vnitřní koagulační cestu zabráněním aktivace kallikrein-kininového systému	<i>H. longicornis</i>	Kato et al., 2005
Ir-CPI (<i>Ixodes ricinus</i> contact phase inhibitor)		- rekombinantní protein interaguje s aktivovanými lidskými fázovými faktory (faktor XIIa, faktor XIa, kallikrein)	<i>I. ricinus</i>	Decrem et al., 2009
HLS1 (<i>Haemaphysalis longicornis</i> serpin 1)	41 kDa	- serpin s antikoagulačními schopnostmi	<i>H. longicornis</i> - střevo	Sugino et al., 2003
HLS2 (<i>Haemaphysalis longicornis</i> serpin 2)	44 kDa	- serpin s antikoagulačními schopnostmi	<i>H. longicornis</i> - hemolymfa nasátých klíšťat	Imamura et al., 2005
	65 kDa	- antikoagulační protein inhibující faktor Xa	<i>R.</i> <i>appendiculatus</i> - slinné žlázy	Limo et al., 1991
	17 kDa	- antikoagulační protein zaměřující se na faktor Xa s dopadem na vnější i vnitřní cestu	<i>H. truncatum</i> - slinné žlázy	Joubert et al., 1995
Amblin	18 kDa	- první protein z hemolymfy klíšťat inhibující trombin	<i>A. hebraeum</i> - hemolymfa	Lai et al., 2004a

Americanin	12 kDa	- vysoce specifický inhibitor trombinu	<i>A. americanum</i> - slinné žlázy	Zhu et al., 1997
Boophilin	23 kDa	- serpin se schopností inhibovat trombin a blokovat amidolytickou aktivitu serinových proteáz podobných trypsinu (trypsin, plasmin...)	<i>R.(B.) microplus</i>	Macedo-Ribeiro et al., 2008
BmAP	60 kDa	- specifický inhibitor trombinu	<i>R.(B.) microplus</i> - sliny	Horn et al., 2000
Hemalin	20 kDa	- inhibitor trombinu s homologií k proteinu z <i>R. (B.) microplus</i> boophilinu	<i>H.longicornis</i> - střevo	Liao et al., 2009
Chimadanin	7,5 kDa	- antikoagulat potlačující aktivitu trombinu	<i>H.longicornis</i> - slinné žlázy	Nakajima et al., 2006
Microphilin	1,8 kDa	- antikoagulační protein inhibující trombin navázáním na obě katalytická místa a exosit 1	<i>R.(B.) microplus</i> - sliny	Ciprandi et al., 2006
NTI 1a 2 (nymphal thrombin inhibitor)	3,2 kDa 14,9 kDa	- inhibitory trombinu, liší se svojí afinitou k trombinu a faktoru Xa	nymfy <i>H. dromedarii</i>	Ibrahim et al., 2001b
Ornithodorin	12,6 kDa	- vysoce selektivní inhibitor trombinu, vázající se do jeho aktivního místa	<i>O. moubata</i>	van de Locht et al., 1996
TCI (tick carboxypeptidase inhibitor)	7, 8 kDa	- peptid inhibující metalo-karboxypeptidázu - specifický inhibitor plazmatické karboxypeptidázy B, známý též jako trombinem aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy	<i>R.bursa</i>	Arolas et al., 2005
Variegin	3,8 kDa	- vysoce afinitní a specifický inhibitor trombinu	<i>A. variegatum</i> - slinné žlázy	Koh et al, 2007

Tab. III.: Přehled molekul inhibujících koagulační kaskádu (pokud není uvedeno jinak, získány z homogenátu celých klíšťat).

2.2.3 Proteiny inhibující koagulaci i agregaci krevních destiček

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte /orgán	Literatura
BmGTI (<i>Boophilus microplus</i> gut thrombin inhibitor)	26 kDa	- první protein inhibující trombin identifikovaný ve střevě - inhibuje trombinem indukované srážení fibrinogenu a agregaci krevních destiček - podporuje činnost aktivovaného proteinu C	<i>R.(B.) microplus</i> - střevo	Ricci et al., 2007
Madanin 1 a 2	7 kDa	- protein inhibující trombin - potlačuje přeměnu fibrinogenu na fibrin stimulovanou trombinem, trombinem katalyzovanou aktivací faktoru V a VIII a trombinem indukovanou agregaci krevních destiček	<i>H. longicornis</i>	Iwanaga et al., 2003

Tab. IV.: Přehled molekul inhibujících jak koagulační kaskádu tak agregaci krevních destiček (pokud není uvedeno jinak, získány z homogenátu celých klíšťat).

2.3. Proteiny s antimikrobiální aktivitou

Slovo lektin pochází z latinského slova legere, což znamená vybrat a odráží schopnost lektinů rozpoznat povrchové molekuly erytrocytů a aglutinovat je, z čehož pochází jejich druhý název aglutininy (Boyd et Shapleigh, 1954). Podle novější definice jsou lektiny proteiny či glykoproteiny s alespoň jedním vazebným místem umožňujícím specifickou a reverzibilní vazbu s cukernou složkou buněčné stěny mikroorganismů (Peumans et van Damme, 1995). Lektin byl poprvé izolován z klíšťáka *O. moubata* a nazván Dorin M (37 kDa). Bylo zjištěno, že má afinitu ke kyselině sialové a N-acetyl-D-glukozaminu. Jeho produkce byla potvrzena ve slinných žlázách a hemocytech (Grubhoffer et Kovář, 1998,

Kovář et al., 2000, Rego et al., 2006). Lektin OMFREP (*Ornithodoros moubata* fibrinogen like protein, 28,9 kDa) byl ze stejného klíštěte a je homologní k Dorinu M (Rego et al., 2005). Dále byl z *O. moubata* izolován galektin (OmGalec, 37,4 kDa), s vazbou afinitní k disacharidům (Huang et al., 2007). Lektiny byly izolovány i z dalších klíšťat a klíšťáků: *I. ricinus*, *O. tholozani*, *O. tartakovskyi*, *A. polonicus*, *R. appendiculatus* (Grubhoffer et al., 2004, Rego et al., 2005, Grubhoffer et al., 2008)

Enzymy se schopností štěpit β -1,4-glykosidické vazby peptidoglykanů v buněčných stěnách bakterií se nazývají lysozymy. V rámci živočišné říše se lysozymy dělí na c-lysozymy (chicken), g-lysozymy (goose) a i-lysozymy (invertebrates), (Grunclová et al., 2003, Sonenshine et Hynes, 2008). První identifikovaný c-lysozym pochází ze střeva klíštěta *O. moubata* (14 kDa). Tento lysozym vykazuje lytickou aktivitu proti bakterii *Micrococcus luteus* (Kopáček et al., 1999). Další c-lysozymy byly identifikovány z klíšťat *D. variabilis* a *D. andersoni* (Simsler et al., 2004).

Jednou ze skupin antimikrobiálních peptidů, které se vyskytují napříč celou živočišnou i rostlinnou říší jsou defensiny. Defensiny jsou malé kladně nabitě peptidy, které právě díky svému náboji působí na cytoplazmatickou membránu bakterií a depolarizují ji, čímž dochází k jejímu narušení. Tato narušení vedou k úniku buněčných iontů a nakonec k destrukci patogenu (Nakajima et al., 2003a). Aktivita defensinů nemusí být směřována pouze k plazmatické membráně, ale může být zaměřena také k jiným molekulám se záporným nábojem, které jsou obsaženy v buňce bakterie, jako jsou RNA, DNA (deoxyribonucleic acid) a enzymy (Hancock et al., 2002). První identifikovaný klíštěcí defensin pochází z hemolymfy klíštěte *D. variabilis* a byl nazván Varisin (4,2 kDa). Bylo zjištěno, že je aktivní proti Gram-pozitivním bakteriím (Johns et al., 2001). Z *D. variabilis* byli následně izolovány další dvě izoformy defensinu, Defensin-2 a VarisinB (Ceraul et al., 2007, Jaworski et al., 2010). Z klíštěte *H. longicornis* byl izolován defensin o velikosti 5,8 kDa, který vykazuje

antimikrobiální aktivitu proti prvoku *Babesia sp.*, ale rovněž proti mikrobiálním houbám a bakteriím (Tsuji et al., 2007). Další čtyři isoformy defensinu byly nalezeny u klíšťáka *O. moubata*. Velmi podobné defensiny (na proteinové úrovni) byly objeveny i u *Ornithodoros tatarovskiyi* a *Ornithodoros puertoricensis* (2 isoformy), *Ornithodoros papillipes* (3 isoformy) a *Ornithodoros rostratus* (1 isoforma), (Nakajima et al., 2001, Chrudimská et al., 2010). U klíšťat *I. scapularis*, *I. persulcatus* a *A. americanum* bylo identifikováno po jedné isoformě defensinu a z *I. ricinus* byly získány isoformy dvě (Rudenko et al., 2005, Hynes et al., 2005, Todd et al., 2007, Saito et al., 2009).

Další protein s antimikrobiální aktivitou byl izolován z hemolymfy bez buněčných komponent klíštěte *R. (B.) microplus* a nazván Mikroplusin (10,2 kDa), (Fogaca et al., 2004). Bylo zjištěno, že má bakteriostatický účinek na Gram-pozitivní bakterie a kvasinky. Mikroplusin má schopnost vázat měďnaté ionty, ty chybějí bakteriím, následkem čehož hynou (Silva et al., 2009).

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte/ orgán	Literatura
DorinM	37 kDa	- lektin afinitní k sialonové kyselině a N-acetyl.glukozaminu	<i>O. moubata</i> -slinné žlázy a hemocyty	Grubhoffer et Kovář, 1998, Kovář et al., 2000, Rego et al., 2006
OmGalectin	37,4 kDa	- lektin vykazující afinitu k disacharidům	<i>O. moubata</i>	Huang et al., 2007
TGL (tick gut lysozyme)	14kDa	- lysozym aktivní proti bakterii <i>M. luteus</i>	<i>O. moubata</i> -střevo	Kopáček et al., 1999 Grunclová et al., 2003
Dv lys (<i>D. variabilis</i> lysozyme)	14 kDa	- lysozym s bakteriolytickou aktivitou	<i>D. variabilis</i> - hemocyty, střevo, tukové těleso	Simser et al., 2004
Da lys (<i>D. andersoni</i> lysozyme)	14 kDa	- lysozym s bakteriolytickou aktivitou	<i>D. andersoni</i> -zárodečná buněčná linie	Simser et al., 2004
Defensin A, B, C, D	4 kDa	- homologní defensiny aktivní proti G+ bakteriím	<i>O. moubata</i> -střevo	Nakajima et al., 2001
Varisin	4,2 kDa	- defensin aktivní	<i>D. variabilis</i>	Johns et al., 2001

		proti G+ bakteriím	-hemocyty	
Defensin 2	4,7 kDa	- antimikrobiální peptid, asi zahrnutý do infekce vaječníků riketsiemi	<i>D. variabilis</i> -ovária, střevo, tukové těleso	Ceraul et al., 2007
Longicin	5,8 kDa (propeptid)	- fungicidní, baktericidní defensin, aktivní proti babesiím	<i>H. longicornis</i> -střevo	Tsuji et al., 2007
HI-gut HI-sal	5,8 kDa (propeptid) 6,5 kDa (propeptid)	- antibakteriální defensin, indukovatelné LPS (lipopolysacharid)	<i>H. longicornis</i> -střevo -slinné žlázy	Zhou et al., 2007
Persulcatusin	4,2 kDa	- defensin aktivní proti G+ bakteriím	<i>I. persulcatus</i> -střevo	Saito et al., 2009
Defensin	4,3 kDa	- defensin aktivní proti <i>M.luteus</i>	<i>R. microplus</i> -hemocyty, tukové těleso a ovária	Fogaca et al., 2004
Defensin	4,5 kDa	- defensin indukovaný nákazou <i>B.burgdorferi</i>	<i>I. ricinus</i> -střevo	Rudenko et al., 2007
ADP1 ADP2 (Amblyomma defensin peptide 1 a 2)	4,6 kDa (ADP2)	- defensin bez kladného náboje, aktivní proti G+ a G- bakteriím	<i>A. hebraeum</i> - hemolymfa	Lai et al., 2004b
Hebraein	11 kDa	- antimikrobiální aktivita proti <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. glabrato</i>	<i>A. hebraeum</i> - hemolymfa	Lai et al., 2004c
Microplusin	10,2 kDa	- bakteriostatický účinek na G+ bakterie a kvasinky - váže měďnaté ionty	<i>R. microplus</i> - hemolymfa, ovária	Fogaca et al., 2004 Silva et al., 2009
Ixodidin	7,1 kDa	- aktivní proti <i>M. luteus</i> - inhibitor chymotripsinové elastázy	<i>R. microplus</i> - hemocyty	Fogaca et al., 2006
Ixosin	2,9 kDa	- antimikrobiální aktivita proti <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>	<i>I. sinensis</i> - slinné žlázy	Yu et al., 2006b
Ixosin B	3,8 kDa	- antimikrobiální aktivita proti <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C.</i>	<i>I. sinensis</i> - slinné žlázy	Liu et al., 2008

		<i>albicans</i>		
IsAMP (<i>I. scapularis</i> antimicrobial peptide)	5,3 kDa	- antimikrobiální aktivita proti G+ a G- bakteriím, regulovanou infekcí boreliemi	<i>I. scapularis</i> - sliny, slinné žlázy, hemocyty, tukové těleso	Pichu et al., 2009
Fragmenty hemoglobinu	3,2 kDa	- silná antimikrobiální aktivita ve střevě proti G+ bakteriím a houbám, vznikají trávením hemoglobinu	<i>R. microplus</i>	Fogaca et al., 1999
Fragmenty hemoglobinu		- antimikrobiální aktivita proti <i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>O. moubata</i>	Nakajima et al., 2003b
Fragmenty hemoglobinu		- antimikrobiální aktivita proti <i>M.</i> <i>luteus</i>	<i>D. variabilis</i>	Sonenshine et al., 2005

Tab. V.: Přehled molekul vykazujících antimikrobiální aktivitu (pokud není uvedeno jinak, získány z homogenátu celých klíšťat).

2.5 Proteázy, inhibitory proteáz a některé další enzymy

2.5.1 Cysteinové proteázy

Cysteinové proteázy klíšťat jsou zahrnuty do procesu trávení, jedná se o proteiny podobné lidským katepsinům B, C, L, proteinu AE (asparaginylní endopeptidáza) a VTDC (vitellin degrading cystein endopeptidase).

Protein IrCB (*Ixodes ricinus* cathepsin B) byl poprvé izolován ze střeva klíštěte *I. ricinus*. Bylo zjištěno, že se vyskytuje ve dvou izoformách, z čehož blíže byla studována první izoforma o velikosti ~ 32 kDa. Ukázalo se, že se účastní spolu s IrCL (*Ixodes ricinus* cathepsin L) proteolýzy velkých fragmentů hemoglobinu na malé fragmenty a další degradace těchto malých fragmentů na dipeptidy a aminokyseliny (Sojka et al., 2008, Horn et al., 2009).

Katepsinu C podobný protein ze střeva klíštěte *I. ricinus* byl označen IrCC (*Ixodes ricinus* cathepsin C), jeho přibližná velikost je 23-25 kDa. IrCC spolu s IrCB štěpí malé fragmenty hemoglobinu na dipeptidy a aminokyseliny (Sojka et al., 2008, Horn et al., 2009).

U klíštěte *H. longicornis* byly poprvé izolovány dvě izoformy HICG (*Haemaphysalis longicornis* tick cysteine proteinase genes, 33,7 kDa a 37 kDa), podobné lidskému katepsinu L, značené písmeny A a B (Mulenga et al., 1999). V roce 2009 byl objeven ve střevě *H. longicornis* další homolog ke katepsinu L, nazvaný HICPL (*H. longicornis* cathepsin L protein) -A (23,1 kDa), (Yamaji et al., 2009). Z larev *R.(B.) microplus* byl izolován protein BmCL1 (*Boophilus microplus* cathepsin L, 23,5 kDa), (Renard et al., 2000). Proteiny podobné katepsinu o velikostech 36,3 kDa a 37,6 kDa byly dále identifikovány u klíštěte *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* a nazvány Cys1 a Cys2 (Chen et al., 2004). Z našeho klíštěte *I. ricinus* byl izolován protein IrCL (30 kDa), u kterého byla pozorována schopnost degradovat hemoglobin za účasti AE a IrCD (*Ixodes ricinus* cathepsin D), (Sojka et al., 2008, Horn et al., 2009).

Legumain (IrAE – *Ixodes ricinus* asparaginyl endopeptidase, proenzym 46,8 kDa) je protein poprvé identifikovaný ze střeva klíštěte *I. ricinus* (Rudenko et al., 2005). Jeho homolog byl objeven i u *H. longicornis* (Sojka et al., 2007, Alim et al., 2010). Bylo zjištěno, že se účastní degradace hostitelova hemoglobinu spolu s homology katepsinu D a L (Horn et al., 2009).

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte/ orgán	Literatura
IrCB	~32 kDa	- forma katepsinu B - štěpí velké fragmenty hemoglobinu na malé a ty na dipeptidy a aminokyseliny	<i>I. ricinus</i> - střevo	Sojka et al., 2008 Horn et al., 2009
IrCC	~23-25 kDa	- proteáza podobná katepsinu C - štěpí malé fragmenty hemoglobinu na dipeptidy a aminokyseliny	<i>I. ricinus</i> - střevo i jiné tkáně	Sojka et al., 2008 Horn et al., 2009
HICG-A HICG-B	33,7 kDa 37 kDa	- homology katepsinu L - účastní se trávení hemoglobinu	<i>H. longicornis</i> -střevo	Mulenga et al., 1999
HICPL-A	23,1 kDa	- proteáza homologní ke	<i>H. longicornis</i>	Yamaji et al.,

		katepsinu L - degraduje hemoglobin	- střevo	2009
BmCL1	23,5 kDa	- proteáza vykazující homologii ke katepsinu L - rekombinantní protein hydrolyzuje hemoglobin, vitelin a gelatin	<i>R. (B.) microplus</i> larvy	Renard et al., 2000
cysA cysB	36,3 kDa 37,6 kDa	- proteáza homologní ke katepsinu L, účastní se hydrolýzy hemoglobinu	<i>R. haemaphysaloides</i>	Chen et al., 2004
IrCL	30 kDa	- proteáza homologní ke katepsinu L štěpící malé fragmenty hostitelova hemoglobinu na dipeptidy a aminokyseliny	<i>I. ricinus</i>	Sojka et al., 2008 Horn et al., 2009
legumain (IrAE)	46,8 kDa proenzym	- proteáza homologní k lidskému AE - účastní se degradace hostitelského hemoglobinu	<i>I. ricinus</i> <i>H. longicornis</i> - střevo	Rudenko et al., 2005 Sojka et al., 2007 Alim et al., 2010
VTDCE	39 kDa	- proteáza, která má schopnost hydrolyzovat hemoglobin, albumin, gelatin a vitelin	<i>R. (B.) microplus</i> - vajíčka	Seixas et al., 2003
Bmcystatin	11 kDa	- cystatin jehož rekombinantní protein má schopnost inhibovat C1 cysteinové peptidázy a VTDCE	<i>R. (B.) microplus</i> - tukové těleso, ovária, extrakt slinných žláz	Lima et al., 2006
Hlcyst1	11 kDa	- intracelulární cystatin - rekombinantní protein inhibuje savčí katepsin L, B, H a klíštěcí HICPL-A - inhibuje degradaci hemoglobinu HICPL-A	<i>H. longicornis</i> - slinné žlázy	Zhou et al., 2009 Yamaji et al., 2010
Hlcyst2	12,9 kDa	- cystatin jehož rekombinantní protein inhibuje papain, katepsin L, B klíštěcí HICPL-A - inhibuje degradaci hemoglobinu HICPL-A	<i>H. longicornis</i> - střevo a hemocyty	Zhou et al., 2006 Yamaji et al., 2010
Hlcyst3	11 kDa	- cystatin, který inhibuje papain a katepsin L	<i>H. longicornis</i> - střevo	Zhou et al., 2010

Tab. VI.: Přehled cysteinových proteáz (pokud není uvedeno jinak, získány z homogenátu celých klíšťat).

2.5.2 Aspartátové peptidázy

Jeden z nejdůležitějších proteinů řadících se k aspartátovým proteázám je homolog lidského katepsinu D nazvaný Longepsin. Longepsin (39,3 kDa) byl poprvé izolován ze slinných žláz a střeva klíštěta *H. longicornis*. Bylo zjištěno, že se účastní proteolýzy hemoglobinu (Boldbaatar et al., 2006). Další homolog katepsinu D byl izolován z vajíček tvrdého klíštěte *R. (B.) microplus* a nazván BYC (*Boophilus* yolk cathepsin). BYC má molekulovou hmotnost 41,8 kDa a hydrolyzuje hemoglobin z hostitelské krve a řídí degradaci vitelinu (Logullo et al., 1998, Abreu et al., 2004).

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte/ orgán	Literatura
BYC	41,8 kDa	- peptidáza homologní pro lidský katepsin D - hydrolyzuje hemoglobin a degraduje vitelin	<i>R. (B.) microplus</i> - hemolymfa, střevo, tukové těleso	Logullo et al., 1998 Abreu et al., 2004
Longepsin	39,3 kDa	- peptidáza homologní k lidskému katepsinu D - proteolýza hemoglobinu	<i>H. longicornis</i> - střevo a slinné žlázy	Boldbaatar et al., 2006
THAP (tick heme-binding aspartic proteinase)	35 kDa	- využívá hem k návázání na vitelin a reguluje jeho degradaci	<i>R. (B.) microplus</i> - vajíčka	Sorgine et al., 2000

Tab. VII.: Přehled aspartátových peptidáz (pokud není uvedeno jinak, získány z homogenátu celých klíšťat).

2.5.3 Serinové proteázy a jejich inhibitory

Serinové proteázy klíšťat představují významnou složku trávicího systému klíšťat. Některé z nich vykazují podobnost se složkami koagulační kaskády a proteiny účastnícími se aktivace komplementu, či trávicími enzymy člověka.

Serpiny (serpin protease inhibitor), jsou rodinou příbuzných proteinů, které se liší svojí funkcí a které kontrolují řadu klíčových proteolytických cest v živých organismech.

Více než 30 serpin kódujících sekvencí bylo klonováno z cDNA klíšťat *A. americanum*, *R. appendiculatus*, *I. ricinus* a *I. scapularis* (Leboulle et al., 2002, Mulenga et al., 2003a, Ribeiro et al., 2006, Mulenga et al., 2007). Jednotliví zástupci jsou popsáni v kapitolách 3.1 a 3.2.

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte/orgán	Literatura
HLSG-1 HLSG-2 (<i>H. longicornis</i> serine proteinase)	37,7 kDa 31,2 kDa	- sekvence HLSG-1: velká podobnost s proteiny z koagulační kaskády a aktivace komplementu - sekvence HLSG-2: velká podobnost s chemotripsinogenem	<i>H. longicornis</i> - střevo, slinné žlázy i jiné orgány	Mulenga et al., 2001
RAMSP-1 RAMSP-2 RAMSP-3 (<i>R. appendiculatus</i> midgut serine proteinase)	32,3 kDa 51,2 kDa 49,5 kDa	- proteázy velmi blízké chemotrypsinu	<i>R. appendiculatus</i> - střevo, slinné žlázy	Mulenga et al., 2003b
HISP (<i>H. longicornis</i> serine proteinase)	50,4 kDa	-proteáza se schopností degradovat albumin	<i>H. longicornis</i>	Miyoshi et al., 2004
HISP2 HISP3	34,2 kDa 35 kDa	- proteázy s homologií s trypsinem podobnými peptidázami - zahrnutý zpracování potravy	<i>H. longicornis</i> - střevo	Miyoshi et al., 2008

Tab. VIII.: Přehled serinových proteáz (pokud není uvedeno jinak, získány z homogenátu celých klíšťat).

2.5.4 Metaloproteázy

Metaloproteázy byly poprvé objeveny u klíštěte *I. scapularis*, kde se vyskytují ve třech izoformách značených MP (metaloprotease) 1 (37 kDa), MP2 a MP3. Bylo zjištěno, že tyto

metaloproteázy vykazují gelatinázovou a fibrinogenolitickou aktivitu. Dále se ukázalo, že patrně ovlivňují přenos spirochéty *B. burgdorferi* (Francischetti et al., 2003). Jiné metaloproteázy byly izolovány z klíšťat *H. longicornis* a *I. ricinus* (Harnnoi et al., 2007, Decrem et al., 2008)

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte/ orgán	Literatura
MP1 MP2 MP3	37 kDa	- proteázy narušující gelatinázovou a fibrinogenolytickou aktivitu - pravděpodobně mají efekt na přenos <i>B. burgdorferi</i>	<i>I. scapularis</i> <i>H. longicornis</i> <i>I. ricinus</i> - slinné žlázy	Francischetti et al., 2003 Harnnoi et al., 2007 Decrem et al., 2008

Tab. IX.: Přehled metaloproteáz.

2.5.5 Aminopeptidázy

V roce 2006 byla z klíštěte *H. longicornis* izolována leucinová aminopeptidáza, která byla nazvána HILAP (*Haemaphysalis longicornis* leucin aminopeptidase). Tento protein o velikosti 56 kDa byl nejprve získán z cytosolu střevních epiteliálních buněk. U nasátých klíšťat byl identifikován i z bazofilních buněk, kde hraje roli v biosyntéze a degradaci proteinů. Dále byl získán z vajíček dospělých partenogenetických jedinců, v kterých nedostatek HILAP má za následek nedostatek živin při dozrávání oocytů. Rekombinantní forma HILAP, exprimovaná v *E. coli*, hydrolyzuje substrát aminopeptidáz a bylo dokázáno, že její aktivita je závislá na Fe^{2+} , Mn^{2+} a inhibována bestatinem (Hatta et al., 2006, Hatta et al., 2009, Hatta et al., 2010).

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte/ orgán	Literatura
HILAP	56 kDa	- důležitý při trávení hostitelovi krve, výživě zrajících oocytů	<i>H. longicornis</i> -střevní epiteliální buňky	Hatta et al., 2006 Hatta et al., 2009 Hatta et al., 2010

Tab. X.: Přehled aminopeptidáz

2.6 Některé další molekuly klíšťat

Z dalších molekul identifikovaných u klíšťat bych ještě zmínila některé kinázy, peroxydázy, proteiny podílející se na metabolismu železa.

Proteinová kináza C je enzym z rodiny serin/threonin specifických proteinových kináz, které jsou aktivovány kyselými fosfolipidy. Byla izolována z klíštěte *R. (B.) microplus* a účastní se regulace endocytózy trávicími buňkami. Tato kináza je specifická pro malé množství nízkomolekulárních proteinů v plazmatické membráně (Liyou et al., 1996).

U klíštěte *A. americanum* byly nalezeny tři izoformy cAPK (cyclic AMP-dependent protein kinase). Enzymy se liší ve své katalytické podjednotce a jsou značeny cAPK-C (42,4 kDa), cAPK-C2 (47,9 kDa), cAPK-C3 (51,9 kDa), (Palmer et al., 1999). K objasnění funkce došlo až u homologních cAPK izolovaných ze samečků *A. hebraeum*. Bylo zjištěno, že hrají klíčovou roli při maturaci spermatidů (Tabish et al., 2006).

Homologii s glutathioninovou peroxidázou nese protein SALP25D (24,6 kDa) ze slinných žláz nasátých i nenásátých nymf *I. scapularis*. Rekombinantní SALP25D je schopen katalyzovat redukci hydrogenperoxidu v přítomnosti redukovaného glutathioninu a glutathioninreduktázy, což jej řadí k významným klíštěcím antioxidantům (Das et al., 2001). Dále bylo zjištěno, že podporuje přenos spirochéty *B. burgdorferi* z hostitele na klíště (Narasimhan et al., 2007).

Proteiny zodpovědné za schopnost klíšťat zpracovat velké množství železa přijaté s hostitelskou krví jsou Ferritin 1 a 2. Ferritin 1 (~ 20 kDa) byl izolován z klíšťat *I. ricinus*, *O. moubata* a *D. variabilis*. Bylo dokázáno, že se v přírodě vyskytuje jako homo-oligomer skládající se z 24 podjednotek, tvořených těžkými řetězci (~500 kDa). protein byl nalezen v mezibuněčných prostorech střeva, nikoli však v hemolymfě. Jak se ukázalo, hromadí železo a tím redukuje jeho množství v intracelulárních prostorech (Kopáček et al., 2003). Ferritin 2 (21 kDa) byl identifikován z hemolymfy klíšťat *I. ricinus* a *R. (B.) microplus*. Bylo zjištěno,

že je výlučným transportním proteinem volného železa mezi hemolymfou ve střevě a periferními tkáněmi (Hajdušek et al., 2009, Hajdušek et al., 2010).

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)	Funkce proteinu	Druh klíštěte/ orgán	Literatura
proteinová kináza C		- kináza účastnící se regulace endocytózy trávicími buňkami	<i>R.(B.) microplus</i>	Liyou et al., 1996
cAPK-C1 cAPK-C2 cAPK-C3	42,4 kDa 47,9 kDa 51,9 kDa	- kináza regulující buněčné mechanismy - má klíčovou roli při zrání spermatidů	<i>A. americanum</i> <i>A. hebraeum</i>	Palmer et al., 1999 Tabish et al., 2006
SALP25D	24,6 kDa	- peroxydáza - antioxidant	<i>I. scapularis</i> - slinné žlázy nymf	Das et al., 2001
PHGPx (phospholipid-hydroperoxide glutathioneperoxidase)		- peroxidáza chránící buňku, zabraňující lipoperoxidaci membrány	<i>R. (B.) microplus</i> <i>I. ricinus</i>	Cossío-Bayúgar et al., 2005
peroxiredo-xin	26 kDa	- enzym zabraňující štěpení DNA oxidativním stresem	<i>H. longicornis</i> - slinné žlázy	Tsuji et al., 2001
Ferritin 1	20 kDa	- protein skladující železo	<i>I. ricinus</i> <i>O. moubata</i> - mezibuněčné prostory, ne hemolymfa	Kopáček et al., 2003
Ferritin 2	21 kDa	- transportní protein volného železa mezi střevem a periferními tkáněmi	<i>I. ricinus</i> <i>R.(B.) microplus</i> - hemolymfa	Hajdušek et al., 2009 Hajdušek et al., 2010

Tab. XI.: Přehled některých dalších významných enzymů (pokud není uvedeno jinak, získány z homogenátu celých klíšťat).

3. DISKUZE

3.1 Využití klíštěcích proteinů

Klíšťata a jejich proteiny se v poslední době dostávají do popředí vědeckého zájmu. Důvodem je jednak sílící snaha a potřeba vytvořit účinné protiklíštěcí vakcíny, které by byly schopny snížit populaci klíšťat a zároveň zamezit přenosu mnoha závažných onemocnění z klíštěte na lidi a zvířata. Druhým důvodem je, že klíšťata během svého životního cyklu produkují celou řadu biologicky aktivních molekul, které se jeví velmi perspektivní pro farmaceutické využití.

3.1.1 Protiklíštěcí vakcíny

Při vývoji klíštěcích vakcín jsou využívány dva typy antigenů. Prvním typem je tzv. exponovaný antigen (exposed antigen), který je obsažen ve slinách klíštěte a hostitel s ním přichází do styku již během sání a k imunitní reakci hostitele dochází tak bezprostředně. Tak zvané skryté antigeny (concealed antigen) představují druhou skupinu antigenů využívanou při vývoji vakcín. Jedná se zejména o antigeny přítomné ve střevě klíšťat.

První a zatím jediná komerčně používaná vakcína je proti klíštěti *R.(B.) microplus*. Toto jednohostitelské klíště, které je přenašečem původců babeziózy a anaplazmózy, velmi výrazně ovlivňuje vitalitu a produktivnost dobytka v subtropických a tropických oblastech. V roce 1986 byl ze střeva klíštěte *R. (B.) microplus* izolován glykoprotein Bm86 (89 kDa), jehož rekombinantní forma byla s úspěchem použita pro imunizaci dobytka (Rand et al., 1989). Poslední výzkumy ukázaly, že tato vakcína je účinná i proti dalším druhům klíšťat rodu *Rhipicephalus* (Canales et al., 2006).

Teprve nedávno byl objeven nový protein Ferritin 2 u klíštěte *I. ricinus*, který slouží jako transportní protein k přenosu volného železa ze střeva přes hemolymfu do periferních

tkání a k zajištění dostatečného množství železa pro zrání vajíček (Hajdušek et al., 2009). Po vakcinaci králíků rekombinantní formou IrFER2 (*Ixodes ricinus* Ferritin 2) se ukázalo, že jejich imunitní odezva na sání na takto imunizovaných králících má za následek zvýšenou úmrtnost klíšťat, snižuje jejich hmotnost a schopnost se reprodukovat o 98%. Druhá vakcinace RmFER2 (*Rhipicephalus microplus* Ferritin 2) proběhla na dobytku a redukce počtu klíšťat *R. microplus* byla pozorována o 64% a *Rhipicephalus annulatus* o 72%. Tyto výsledky ukazují, že bude pravděpodobně možno využít Ferritin 2 jako další protiklíštěcí vakcínu (Hajdušek et al., 2010). V současné době běží další pokusy o experimentální vakcinaci hostitelů mnoha dalšími proteiny, jako jsou například Sialostatin L2 (Kotsyfakis et al., 2008), HLS-1 a HLS-2 (Mulenga et al., 2000). Alespoň některé z testovaných proteinů by se mohly v brzké době stát základem nové protiklíštěcí vakcíny s cílem úspěšně tlumit počty klíšťat, zdravotní a ekonomické následky.

Z pokusných vakcinací, které zatím proběhly, vyplývá, že účinnějšími kandidáty pro vakcínu nové generace budou spíše exogenní antigeny. Skryté antigeny nemusí při imunizaci zabránit přenosu patogenů (Mulenga et al., 2000). Další výhodou exogenních antigenů je, že by nemusela být prováděna opakovaná imunizace – hostitel by byl vystaven klíštěcím proteinům při každém sání, což by snadno udržovalo vysokou hladinu protilátek. Pro vývoj vakcín by tedy měli být vhodnými kandidáty látky s imunosupresivními a antihemostatickými účinky.

3.1.2 Medicínsky významné klíštěcí molekuly

Protein klíštěcích slin SALP15 je od jeho objevu nejvíce studovaným proteinem pro jeho možné medicínské využití. SALP15 byl poprvé izolovaný ze slin klíštěte *I. scapularis* a hraje v životě klíštěte významnou roli pro své imunomodulační vlastnosti. Dále jej využívají i spirochéty *B. burgdorferi* pro již zmíněný SAT-efekt, který usnadňuje přenos borelií do těla

hostitele během sání (Anguita et al., 2002). Pro inhibiční efekt proteinu SALP15 na aktivaci T-buněk byl zkoumán jeho vliv v modelu experimentálně vyvolaného astma. Bylo dokázáno, že SALP15 blokuje vývoj Th2 cytokinové imunitní odpovědi a tím zabraňuje vývoji astmatického procesu u myši BALB/cJ (Paveglio et al., 2007). V jiných studiích byla studována inhibice navázání viru HIV (human imunodeficiency virus) na CD4+ receptory T-buněk. To dokonce slibuje možnost využít klíčecí protein SALP15 v neutralizační vakcíně proti HIV (Juncadella et al., 2008).

Další možnosti medicínského využití klíčecích proteinů byly zkoumány na antikoagulačním peptidu Ixolaris z klíštěte *I. scapularis* (Francischnetti et al., 2002). Ixolaris byl použit pro navázání TF z lidské buněčné glyblastomové linie v myších, což mělo za následek zastavení růstu nádoru a redukci jeho vaskularizace (Carneiro-Lobo et al., 2009).

Jiné možnosti využití molekul produkovaných klíštětem ve farmakologii jsou rozsáhlé. Například použití imunosupresivních látek ze slinných žláz klíšťat (např. BIP, BIF, IL-2 BP) by mohlo vést k nahrazení současných léků používaných pro potlačení imunitního systému po transplantacích či při autoimunitních chorobách. Potenciální cíle pro využití v medicíně, představují také antihemostatické látky (např. IRIS, TAP, Moubatin), které by mohly vést k vývoji protisrážlivých látek, jenž by umožňovaly lepší prevenci trombotických komplikací po operačních výkonech či úrazech. Antimikrobiální látky by mohly najít uplatnění při léčbě mnoha vážných onemocnění způsobovaných dnes již resistantními kmeny bakterií a protozoálními parazity (např. methycilin resistantní *Staphylococcus aureus*, *Babesia microti*, *Babesia canis* atd.) .

4. ZÁVĚR

Klíšťata se stále více ukazují být inspirací pro lidskou zvědavost a tvořivost. Mechanismy, kterými se brání hostitelské imunitě a hemostáze, a nikým nepozorování dokáží i několik dní přichycení na kůži sát, jsou opravdu pozoruhodné. Ovšem i tak vynalézaví tvorové jako klíšťata mohou být využíváni jinými organismy. Zářným příkladem toho je slinnými žlázami aktivovaný přenos například spirochéty *B. burgdorferi* či *A. phagocytophylum*. Otázkou nyní zůstává, zda-li člověk, jak se už mnohokrát v historii ukázalo, dokáže těžit ze slabín svého soupeře či se od něj dokonce něco přiučit.

5. POUŽITÉ ZKRATKY

AE	asparaginyl endopeptidase
ADP	adenosindiphosphate
ADP 1 a 2	<i>Amblyoma</i> defensin peptide 1 a 2
AMP	adenosinmonophosphate
APC	antigen presenting cells
ATP	adenosintriphosphate
BIF	B-cell inhibitory factor
BIP	B-cell inhibitory protein
BmAP	<i>Boophilus microplus</i> aspartic proteinase
BmCL	<i>Boophilus microplus</i> cathepsin L
Bmcystatin	<i>Boophilus microplus</i> cystatin
BmGTI	<i>Boophilus microplus</i> gut trombin inhibitor
BPTI	basic pancreatic trypsin inhibitor
BYC	<i>Boophilus</i> yolk cathepsin
cAPK	cyclic AMP-dependent protein kinase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHBPs	chemokine binding proteins
ConA	concanavalin A
CRT	calreticulin
Da lys	<i>Dermaacentor andersoni</i> lysozyme
DNA	deoxyribonucleic acid
Dv lys	<i>Dermaacentor variabilis</i> lysozyme
DTH	delayed-type hypersensitivity
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid

fXaI	faktor Xa inhibitor
HIV	human immunodeficiency virus
HI-gut	<i>Haemaphysalis longicornis</i> gut defensin
HI-sal	<i>Haemaphysalis longicornis</i> salivary gland defensin
HICG	<i>Haemaphysalis longicornis</i> tick cysteine proteinase genes
HICPL	<i>Haemaphysalis longicornis</i> cathepsin protein L
Hlcyst	<i>Haemaphysalis longicornis</i> cystatin
HILAP	<i>Haemaphysalis longicornis</i> leucin aminopeptidase
HLS	<i>Haemaphysalis longicornis</i> serpin
HLSG	<i>Haemaphysalis longicornis</i> serine protease gene
HISP	<i>Haemaphysalis longicornis</i> serine protease
IgGBP	imunoglobulin G binding proteins
IL	interleukin
IL-2 BP	interleukin-2 binding protein
INF	interferon
IRAC	<i>Ixodes ricinus</i> anticomplement
IrAE	<i>Ixodes ricinus</i> asparaginyl endopeptidase
IrCB	<i>Ixodes ricinus</i> cathepsin B
IrCC	<i>Ixodes ricinus</i> cathepsin C
IrCL	<i>Ixodes ricinus</i> cathepsin L
Ir-CPI	<i>Ixodes ricinus</i> contact phase inhibitor
IrFER2	<i>Ixodes ricinus</i> ferritin 2
IRIS	<i>Ixodes ricinus</i> serpin
IRS-2	<i>Ixodes ricinus</i> serpin 2
ISAC	<i>Ixodes scapularis</i> anticomplement

IsAMP	<i>Ixodes scapularis</i> antimicrobial peptide
IsSMase	<i>Ixodes scapularis</i> sphigomyelin phosphodiesterase
LPS	lipopolysaccharide
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MP	metalloprotease
NK	natural killer
NTI	nymphal trombin inhibitor
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGF ₂	prostaglandin F ₂
PHA	phytohemagglutinin
PHGPx	phospholipid-hydroperoxide glutathioneperoxidase
OMCI	<i>Ornithodoros moubata</i> complement inhibitor
OMFREP	<i>Ornithodoros moubata</i> fibrinogen like protein
OmGalec	<i>Ornithodoros moubata</i> galectin
RAMSP	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> midgut serine protease
RGD	motif consists of Arg-Gly-Asp amino acids
RmFER2	<i>Rhipicephalus microplus</i> ferritin 2
RNA	ribonucleic acid
SALP	salivary gland protein
SAT	saliva activated transmission
serpin	serine protease inhibitor
TAP	tick anticoagulant peptide
TCI	tick carboxypeptidase inhibitor
TCR	T-cell receptor

TF	tissue factor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TGL	tick gut lysozyme
THAP	tick heme-binding aspartic protease
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRAP	trombin activated protein
VTDCE	vitellin degrading cysteine endopeptidase
5-HT	5-hydroxytryptamin

6 SEZNAM LITERATURY

Abreu, L. A., Valle, D., Manso, P. P., Façanha, A. R., Pelajo-Machado, M., Masuda, H., Masuda, A., Vaz, I. Jr., Lenzi, H., Oliveira, P. L., Logullo, C. (2004). Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol.* 34:443-9.

Agyei, A. D., Runham, N. W., Blackstock, N. (1992). Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *Exp Appl Acarol.* 13:187-212.

Alarcon-Chaidez, F. J., Müller-Doblies, U. U., Wikel, S. (2003). Characterization of a recombinant immunomodulatory protein from the salivary glands of *Dermacentor andersoni*. *Parasite Immunol.* 25:69-77.

Alarcon-Chaidez, F. J., Boppana, V. D., Hagymasi, A. T., Adler, A. J., Wikel, S. K. (2009). A novel sphingomyelinase-like enzyme in *Ixodes scapularis* tick saliva drives host CD4 T cells to express IL-4. *Parasite Immunol.* 31:210-9.

Arolas, J. L., Lorenzo, J., Rovira, A., Castellà, J., Aviles, F. X., Sommerhoff, C. P. (2005). A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. *J Biol Chem.* 280:3441-8.

Andrade, B. B., Teixeira, C. R., Barral, A., Barral-Netto, M. (2005). Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad Bras Cienc.* 77:665-93.

Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P. W., Rincón, M., Kantor, F. S., Fikrig, E. (2002). Salp15, an *ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity.* 16:849-59.

Antuch, W., Güntert, P., Billeter, M., Hawthorne, T., Grossenbacher, H., Wüthrich, K. (1994). NMR solution structure of the recombinant tick anticoagulant protein (rTAP), a factor Xa inhibitor from the tick *Ornithodoros moubata*. *FEBS Lett.* 352:251-7.

Bergman, D. K., Palmer, M. J., Caimano, M. J., Radolf, J. D., Wikel, S. K. (2000). Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland. *J Parasitol.* 86:516-25.

Boldbaatar, D., Sikalizyo Sikasunge, C., Battsetseg, B., Xuan, X., Fujisaki, K. (2006). Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 36:25-36.

Bowman, A. S., Nuttall, P. A. (2008). *Ticks – Biology, Disease and Control.* Cambridge University Press

Bowman, A. S., Ball, A., Sauer, R.: Tick salivary glands: the physiology of tick water balance and their role in pathogen trafficking and transmission. - Bowman, A. S., Nuttall, P. A. (2008). *Ticks – Biology, Disease and Control.* Cambridge University Press, 73-81

- Boyce, J. A. (2004). The biology of the mast cell. *Allergy Asthma Proc.* 25:27-30.
- Boyd, W. C., Shapleigh, E. (1954). Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science.*119:419.
- Borovicková, B., Hypsa, V. (2005). Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. *Exp Appl Acarol.* 35:317-33.
- Caffrey, C. R., McKerrow, J. H., Salter, J. P., Sajid M. (2004). Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.* 20:241-8.
- Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcón, V., Rodríguez, M., de la Fuente, J. (1997). Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine.* 15:414-22.
- Carneiro-Lobo, T. C., König, S., Machado, D. E., Nasciutti, L. E., Forni, M. F., Francischetti, I. M., Sogayar, M. C., Monteiro, R. Q. (2009). Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. *J Thromb Haemost.* 7:1855-64.
- Chen, L. Z., Zhou, J. L., Zhou, Y. Z., Gong, H. Y., Li, P. Y. (2004). Molecular cloning of two *Rhipicephalus haemaphysaloides* haemaphysaloides cathepsin L-like cysteine proteinase gene *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 20:203-8.
- Chrudimská, T., Chrudimský, T., Golovchenko, M., Rudenko, N., Grubhoffer, L. (2010). New defensins from hard and soft ticks: similarities, differences, and phylogenetic analyses. *Vet Parasitol.* 167:298-303.
- Chmelar, J., Oliveira, C. J., Rezacova, P., Francischetti, I. M., Kovarova, Z., Pejler, G., Kopacek, P., Ribeiro, J. M., Mares, M., Kopecky, J., Kotsyfakis, M. (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood.* 117:736-44.
- Ciprandi, A., de Oliveira, S. K., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C. (2006). *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp Parasitol.* 114(1):40-6.
- Ceraul, S. M., Dreher-Lesnack, S. M., Gillespie, J. J., Rahman, M. S., Azad, A. F. (2007). New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infect Immun.* 75:1973-83.
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda, E., Holman, P. J. (2005). Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 35:1378-87.
- Couvreur, B., Beaufays, J., Charon, C., Lahaye, K., Gensale, F., Denis, V., Charlotiaux, B., Decrem, Y., Prévôt, P. P., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2008). Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS One.* 3:e1400.

Daix, V., Schroeder, H., Praet, N., Georgin, J. P., Chiappino, I., Gillet, L., de Fays, K., Decrem, Y., Leboulle, G., Godfroid, E., Bollen, A., Pastoret, P. P., Gern, L., Sharp, P.M., Vanderplasschen, A. (2007). Ixodes ticks belonging to the Ixodes ricinus complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol Biol.* 16:155-66.

Das, S., Marcantonio, N., Deponte, K., Telford, S. R. 3rd, Anderson, J. F., Kantor, F. S., Fikrig, E. (2000). SALP16, a gene induced in Ixodes scapularis salivary glands during tick feeding. *Am J Trop Med Hyg.* 62:99-105.

Das, S., Banerjee, G., DePonte, K., Marcantonio, N., Kantor, F. S., Fikrig, E. (2001). Salp25D, an Ixodes scapularis antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *J Infect Dis.* 184:1056-64.

Decrem, Y., Beaufays, J., Blasioli, V., Lahaye, K., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2008). A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick Ixodes ricinus. *FEBS J.* 275:1485-99.

Decrem, Y., Rath, G., Blasioli, V., Cauchie, P., Robert, S., Beaufays, J., Frère, J. M., Feron, O., Dogné, J. M., Dessy, C., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2009). Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick Ixodes ricinus, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *J Exp Med.* 206:2381-95.

Delves, P. J., Roitt, I.M. (2000). The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 343:37-49.

Delves, P. J., Roitt, I.M. (2000). The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 343:108-17.

Déruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A. L., Dias, J. M., Coelho, F. M., Russo, R. C., Ferreira, B. R., Graham, G. J., Shaw, J. P., Wells, T. N., Teixeira, M. M., Power, C. A., Proudfoot, A. E. (2008). Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J Exp Med.* ;205:2019-31.

Dickinson, R. G., O'Hagan, J. E., Schotz, M., Binnington, K. C., Hegarty, M. P. (1976). Prostaglandin in the saliva of the cattle tick Boophilus microplus. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 54:475-86.

Ferreira, C. A., Da Silva Vaz, I., da Silva, S. S., Haag, K. L., Valenzuela, J. G., Masudam A. (2002). Cloning and partial characterization of a Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Exp Parasitol.* 101:25-34.

Fogaça, A. C., da Silva, P. I. Jr., Miranda, M. T., Bianchi, A. G., Miranda, A., Ribolla, P. E., Daffre, S. (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick Boophilus microplus. *J Biol Chem.* 274:25330-4.

Fogaça, A. C., Lorenzini, D. M., Kaku, L. M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S. (2004). Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick Boophilus microplus: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev Comp Immunol.* 28:191-200.

Fogaça, A. C., Almeida, I. C., Eberlin, M. N., Tanaka, A. S., Bulet, P., Daffre, S. (2006). Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides*. 27:667-74.

Foley, J., Nieto, N. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* subverts tick salivary gland proteins. *Trends Parasitol*. 23:3-5.

Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99:3602-12.

Francischetti, I. M., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. (2003). Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 305:869-75.

Francischetti, I. M., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. (2004). Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb Haemost*. 91:886-98.

Frauenschuh, A., Power, C. A., Déruaz, M., Ferreira, B. R., Silva, J. S., Teixeira, M. M., Dias, J. M., Martin, T., Wells, T. N., Proudfoot, A. E. (2007). Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *J Biol Chem*. 282:27250-8.

Garg, R., Juncadella, I. J., Ramamoorthi, N., Ashish, Ananthanarayanan, S. K., Thomas, V., Rincón, M., Krueger, J. K., Fikrig, E., Yengo, C. M., Anguita, J. (2006). Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J Immunol*. 177:6579-83.

García-Varas, S., Manzano-Román, R., Fernández-Soto, P., Encinas-Grandes, A., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R. (2010). Purification and characterisation of a P-selectin-binding molecule from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* that induces protective anti-tick immune responses in pigs. *Int J Parasitol*. 40:313-26.

Gaspar, A. R., Crause, J. C., Neitz, A. W. (1995). Identification of anticoagulant activities in the salivary glands of the soft tick, *Ornithodoros savignyi*. *Exp Appl Acarol*. 19:117-27..

Gillespie, R. D., Dolan, M. C., Piesman, J., Titus, R. G. (2001). Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J Immunol*. 166:4319-26.

Grubhoffer, L., Kovář, V.: Arthropod lectins: affinity approaches in analysis and reparation of carbohydrate binding proteins. - Wiesner, A., Dunphy, G.B., Marmars, V.J., Morishima, I., Sugamaram, M., Yamakava, M. (1998). *Techniques in Insect Immunology FITC-5*. SOS Publications, 47-57.

Grubhoffer, L., Kovár, V., Rudenko, N. (2004). Tick lectins: structural and functional properties. *Parasitology*. 129 Suppl:S113-25.

Grubhoffer, L., Rego, R. O. M., Hajdušek, O., Hypša, V., Kovář V., Rudenko, N., Oliver, J. H. Jr.: Tick lectins and fibrinogen-related proteins - Bowman, A. S., Nuttall, P. A. (2008). *Ticks – Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, 127-142.

Grunclová, L., Fouquier, H., Hypsa, V., Kopáček, P. (2003). Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Dev Comp Immunol*. 27:651-60.

Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Buresova, V., Franta, Z., Sauman, I., Winzerling, J., Grubhoffer, L. (2009). Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:1033-8.

Hajdusek, O., Almazán, C., Loosova, G., Villar, M., Canales, M., Grubhoffer, L., Kopacek, P., de la Fuente, J. (2010). Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine*. 28:2993-8.

Hancock, R. E., Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett*. 206:143-9.

Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J. M., Bowman, A. S. (2004). Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. *Immunology*. 113:401-8.

Harnnoi, T., Sakaguchi, T., Nishikawa, Y., Xuan, X., Fujisaki, K. (2007). Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 147:93-101.

Hatta, T., Kazama, K., Miyoshi, T., Umemiya, R., Liao, M., Inoue, N., Xuan, X., Tsuji, N., Fujisaki, K. (2006). Identification and characterisation of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Int J Parasitol*. 36:1123-32.

Hatta, T., Tsuji, N., Miyoshi, T., Alim, M. A., Islam, M. K., Fujisaki, K. (2009). Leucine aminopeptidase in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*: endogenous expression profiles in midgut. *J Vet Med Sci*. 71:589-94.

Hatta, T., Tsuji, N., Miyoshi, T., Islam, M. K., Alim, M. A., Yamaji, K., Anisuzzaman, Fujisaki, K. (2010). Leucine aminopeptidase, HILAP, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, plays vital roles in the development of oocytes. *Parasitol Int*. 59:286-9.

Hojgaard, A., Biketov, S. F., Shtannikov, A. V., Zeidner, N. S., Piesman, J. (2009). Molecular identification of Salp15, a key salivary gland protein in the transmission of lyme disease spirochetes, from *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 46:1458-63.

Hepburn, N. J., Williams, A. S., Nunn, M. A., Chamberlain-Banoub, J. C., Hamer, J., Morgan, B. P., Harris, C. L. (2007). In vivo characterization and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem*. 282:8292-9.

Horn, F., dos Santos, P. C., Termignoni, C. (2000). Boophilus microplus anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. Arch Biochem Biophys. 384:68-73.

Horn, M., Nussbaumerová, M., Sanda, M., Kovárová, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C. R., Kopáček, P., Mares, M. (2009). Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. Chem Biol. 16:1053-63.

Hovius, J. W., Ramamoorthi, N., Van't Veer, C., de Groot, K. A., Nijhof, A. M., Jongejan, F., van Dam, A. P., Fikrig, E. (2007). Identification of Salp15 homologues in Ixodes ricinus ticks. Vector Borne Zoonotic Dis. 7:296-303.

Hovius, J. W., de Jong, M. A., den Dunnen, J., Litjens, M., Fikrig, E., van der Poll, T., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B. (2008). Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. PLoS Pathog. 4:e31.

Huang, X., Tsuji, N., Miyoshi, T., Nakamura-Tsuruta, S., Hirabayashi, J., Fujisaki, K. (2007). Molecular characterization and oligosaccharide-binding properties of a galectin from the argasid tick Ornithodoros moubata. Glycobiology. 17:313-23.

Hynes, W. L., Ceraul, S. M., Todd, S. M., Seguin, K. C., Sonenshine, D. E. (2005). A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, Ixodes scapularis. Med Vet Entomol. 19:339-44.

Ibrahim, M. A., Ghazy, A. H., Maharem, T. M., Khalil, M. I. (2001)a. Factor Xa (FXa) inhibitor from the nymphs of the camel tick Hyalomma dromedarii. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 130:501-12.

Ibrahim, M. A., Ghazy, A. H., Maharem, T., Khalil, M. (2001)b. Isolation and properties of two forms of thrombin inhibitor from the nymphs of the camel tick Hyalomma dromedarii (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol. 25:675-98.

Imamura, S., da Silva, Vaz. Junior I, Sugino, M., Ohashi, K., Onuma, M. (2005). A serine protease inhibitor (serpin) from Haemaphysalis longicornis as an anti-tick vaccine. Vaccine. 23:1301-11.

Iwanaga, S., Okada, M., Isawa, H., Morita, A., Yuda, M., Chinzei, Y. (2003). Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, Haemaphysalis longicornis. Eur J Biochem. 270:1926-34.

Jaworski, D. C., Jasinskas, A., Metz, C. N., Bucala, R., Barbour, A. G. (2001). Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, Amblyomma americanum. Insect Mol Biol. 10:323-31.

Jaworski, D. C., Zou, Z., Bowen, C. J., Wasala, N. B., Madden, R., Wang, Y., Kocan, K. M., Jiang, H., Dillwith, J. W. (2010). Pyrosequencing and characterization of immune

response genes from the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (L.). *Insect Mol Biol.* 19:617-30. doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01037.x.

Johns, R., Sonenshine, D. E., Hynes, W. L. (2001). Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 31:857-65.

Jones, L. D., Hodgson, E., Nuttall, P. A. (1989). Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J Gen Virol.* 70:1895-8.

Jones, L. D., Matthewson, M., Nuttall, P. A. (1992). Saliva-activated transmission (SAT) of Thogoto virus: dynamics of SAT factor activity in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum*, and *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol.* 13:241-8.

Joubert, A. M., Crause, J. C., Gaspar, A. R., Clarke, F. C., Spickett, A. M., Neitz, A. W. (1995). Isolation and characterization of an anticoagulant present in the salivary glands of the bont-legged tick, *Hyalomma truncatum*. *Exp Appl Acarol.* 19:79-92.

Joubert, A. M., Louw, A. I., Joubert, F., Neitz, A. W. (1998). Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Exp Appl Acarol.* 22:603-19.

Juncadella, I. J., Garg, R., Ananthnarayanan, S. K., Yengo, C. M., Anguita, J. (2007). T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 49:433-8.

Juncadella, I. J., Garg, R., Bates, T. C., Olivera, E. R., Anguita, J. (2008). The *Ixodes scapularis* salivary protein, salp15, prevents the association of HIV-1 gp120 and CD4. *Biochem Biophys Res Commun.* 367:41-6.

Kaewhom, P., Stich, R. W., Needham, G. R., Jittapalapong, S. (2008). Molecular analysis of calreticulin expressed in salivary glands of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* indigenous to Thailand. *Ann N Y Acad Sci.* 1149:53-7.

Karczewski, J., Endris, R., Connolly, T.M. (1994). Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. *J Biol. Chem.* 269:6702-8.

Kato, N., Iwanaga, S., Okayama, T., Isawa, H., Yuda, M., Chinzei, Y. (2005). Identification and characterization of the plasma kallikrein-kinin system inhibitor, haemaphysalin, from hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Thromb Haemost.* 93:359-67.

Keller, P. M., Waxman, L., Arnold, B. A., Schultz, L. D., Condra, C., Connolly, T. M. (1993). Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *J Biol Chem.* 268:5450-6.

Koh, C. Y., Kazimirova, M., Trimnell, A., Takac, P., Labuda, M., Nuttall, P. A., Kini, R. M. (2007). Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. *J Biol Chem.* 282:29101-13.

Konnai, S., Nakajima, C., Imamura, S., Yamada, S., Nishikado, H., Kodama, M., Onuma, M., Ohashi, K. (2009). Suppression of cell proliferation and cytokine expression by HL-p36, a tick salivary gland-derived protein of *Haemaphysalis longicornis*. *Immunology*. 126:209-19.

Kopáček, P., Vogt, R., Jindrák, L., Weise, C., Safářík, I. (1999). Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol*. 29:989-97.

Kopáček, P., Zdychová, J., Yoshiga, T., Weise, C., Rudenko, N., Law, J. H. (2003). Molecular cloning, expression and isolation of ferritins from two tick species--*Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 33:103-13.

Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M., Mather, T.N., Andersen, J.F., Ribeiro, J. M. (2006). Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem*. 281(36):26298-307.

Kotsyfakis, M., Anderson, J. M., Andersen, J. F., Calvo, E., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Valenzuela, J. G., Ribeiro, J. M. (2008). Cutting edge: Immunity against a "silent" salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J Immunol*. 181:5209-12.

Kotsyfakis, M., Horka, H., Salat, J., Andersen, J. F. (2010). The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Mol Microbiol*. 77:456-70..

Kovár, L., Kopecký, J., Ríhová, B. (2002). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. *Parasitol Res*. 88:1066-72.

Kovár, V., Kopáček, P., Grubhoffer, L. (2000). Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol*. 30:195-205.

Kovářová, Z., Chmelař, J., Sanda, M., Brynda, J., Mareš, M., Rezáčová, P. (2010). Crystallization and diffraction analysis of the serpin IRS-2 from the hard tick *Ixodes ricinus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 66:1453-7.

Krocová, Z., Macela, A., Hernychová, L., Kroca, M., Pechová, J., Kopecký, J. (2003). Tick salivary gland extract accelerates proliferation of *Francisella tularensis* in the host. *J Parasitol*. 89:14-20.

Labuda, M., Danielova, V., Jones, L.D., Nuttall, P.A. (1993). Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med Vet Entomol*. 7:339-42.

Lai, R., Takeuchi, H., Jonczy, J., Rees, H. H., Turner, P. C. (2004)a. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene*. 342:243-9.

Lai, R., Lomas, L. O., Jonczy, J., Turner, P. C., Rees, H. H. (2004)b. Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem J.* 379:681-5.

Lai, R., Takeuchi, H., Lomas, L. O., Jonczy, J., Rigden, D. J., Rees, H. H., Turner, P. C. (2004)c. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *FASEB J.* 18:1447-9.

Lawrie, C. H., Randolph, S. E., Nuttall, P. A. (1999). Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Exp Parasitol.* 93:207-14.

Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E. (2002). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J Biol Chem.* 277:10083-9.

Liao, M., Zhou, J., Gong, H., Boldbaatar, D., Shirafuji, R., Battur, B., Nishikawa, Y., Fujisaki, K. (2009). Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Insect Physiol.* 55:164-73.

Lima, C. A., Sasaki, S. D., Tanaka, A. S. (2006). Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 347:44-50.

Limo, M. K., Voigt, W. P., Tumbo-Oeri, A. G., Njogu, R. M., ole-MoiYoi, O. K. (1991). Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Exp Parasitol.* 72:418-29.

Liu, Z., Liu, H., Liu, X., Wu, X. (2007). Purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 149:557-61.

Liyou, N., Hamilton, S., Watters, D. J., Tellam, R., Willadsen, P. (1996). Endocytosis by digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*: regulation by protein kinase C. *Insect Biochem Mol Biol.* 26:147-54.

Logullo, C., Vaz Ida, S., Sorgine, M. H., Paiva-Silva, G. O., Faria, F. S., Zingali, R. B., De Lima, M. F., Abreu, L., Oliveira, E. F., Alves, E. W., Masuda, H., Gonzales, J. C., Masuda, A., Oliveira, P. L. (1998). Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology.* 116 :525-32.

Macedo-Ribeiro, S., Almeida, C., Calisto, B. M., Friedrich, T., Mentele, R., Stürzebecher, J., Fuentes-Prior, P., Pereira, P.J. (2008). Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One.* 3:e1624

Mans, B. J., Gaspar, A. R., Louw, A. I., Neitz, A. W. (1998). Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Appl Acarol.* 22:353-66.

Mans, B. J., Coetzee, J., Louw, A. I., Gaspar, A. R., Neitz, A.W. (2000). Disaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Appl Acarol.* 24:271-82.

Mans, B. J., Louw, A. I., Neitz, A. W. (2002). Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *J Biol Chem.* 277:21371-8.

Mans, B. J., Ribeiro, J. M., Andersen, J. F. (2008)a. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. *J Biol Chem.* 283(27):18721-33.

Mans, B. J., Andersen, J. F., Schwan, T. G., Ribeiro, J. M. (2008)b. Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family. *Insect Biochem Mol Biol.* 38:22-41.

Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M. K., Kamio, T., Fujisaki, K. (2004). Cloning and molecular characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 34:799-808.

Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M. K., Alim, M. A., Hatta, T., Huang, X., Fujisaki, K. (2008). A set of serine proteinase paralogs are required for blood-digestion in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol Int.* 57:499-505.

Mori, A., Konnai, S., Yamada, S., Hidano, A., Murase, Y., Ito, T., Takano, A., Kawabata, H., Onuma, M., Ohashi, K. (2010). Two novel Salp15-like immunosuppressant genes from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze tick. *Insect Mol Biol.* 19:359-65.

Monteiro, R. Q., Rezaie, A. R., Ribeiro, J. M., Francischetti, I. M. (2005). Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochem J.* 387:871-7.

Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7:145-73.

Mulenga, A., Sugimoto, C., Ingram, G., Ohashi, K., Onuma, M. (1999). Molecular cloning of two *Haemaphysalis longicornis* cathepsin L-like cysteine proteinase genes. *J Vet Med Sci.* 61:497-502.

Mulenga, A., Sugimoto, C., Onuma, M. (2000). Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect.* 2:1353-61.

Mulenga, A., Sugimoto, C., Ingram, G., Ohashi, K., Misao, O. (2001). Characterization of two cDNAs encoding serine proteinases from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 31:817-25.

Mulenga, A., Tsuda, A., Onuma, M., Sugimoto, C. (2003)a. Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Insect Biochem Mol Biol.* 33:267-76.

Mulenga, A., Misao, O., Sugimoto, C. (2003)b. Three serine proteinases from midguts of the hard tick *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Exp Appl Acarol.* 29:151-64.

Mulenga, A., Khumthong, R., Blandon, M. A. (2007).Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *J Exp Biol.* 210:3188-98.

Nakajima, Y., van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D., Yamakawa, M. (2001). Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 31:747-51.

Nakajima, Y., Ishibashi, J., Yukuhiro. F., Asaoka, A., Taylor, D., Yamakawa, M. (2003)a. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta.*1624:125-30.

Nakajima, Y., Ogihara, K., Taylor, D., Yamakawa, M. (2003)b.Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *J Med Entomol.* 40:78-81.

Nakajima, C., Imamura, S., Konnai, S., Yamada, S., Nishikado, H., Ohashi, K., Onuma, M. (2006). A novel gene encoding a thrombin inhibitory protein in a cDNA library from *Haemaphysalis longicornis* salivary gland. *J Vet Med Sci.* 68:447-52.

Narasimhan, S., Koski, R. A., Beaulieu, B., Anderson, J. F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M., Fikrig, E. (2002). A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol Biol.* 11:641-50.

Narasimhan, S., Sukumaran, B., Bozdogan, U., Thomas, V., Liang, X., DePonte, K., Marcantonio, N., Koski, R. A., Anderson, J. F., Kantor, F., Fikrig, E. (2007). A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host Microbe.* 2:7-18.

Nienaber, J., Gaspar, A. R., Neitz, A.W. (1999). Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Parasitol.* 93:82-91.

Nunn, M. A., Sharma, A., Paesen, G. C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A. C., Nuttall, P. A. (2005). Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Immunol.*174:2084-91.

Ogden, N. H., Casey, A. N., French, N. P., Woldehiwet, Z. (2002). A review of studies on the transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from sheep: implications for the force of infection in endemic cycles. *Exp Appl Acarol.* 28:195-202.

Oliver, J. H. (1989). Biology and systematics of ticks (Acari:Ixodida). Annual Reviews, Palo Alto

Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A., Stuart, D. I. (1999). Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol Cell.* 3:661-71.

Palmer, M. J., McSwain, J. L., Spatz, M. D., Tucker, J. S., Essenberg, R. C., Sauer, J. R. (1999). Molecular cloning of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit isoforms from the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Insect Biochem Mol Biol.* 29:43-51.

Parizi, L. F., Rech, H., Ferreira, C. A., Imamura, S., Ohashi, K., Onuma, M., Masuda, A., Vaz Ida, S. Jr. (2009). Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus calreticulins*. *Vet Parasitol.* 164:282-90.

Paveglio, S. A., Allard, J., Mayette, J., Whittaker, L. A., Juncadella, I., Anguita, J., Poynter, M. E. (2007). The tick salivary protein, Salp15, inhibits the development of experimental asthma. *J Immunol.* 178:7064-71.

Pechová, J., Stěpánová, G., Kovár, L., Kopecký, J. (2002). Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia Parasitol (Praha)* 49:153-9.

Pechová J, Kopecký J, Salát J. (2004). Effect of tick salivary gland extract on the cytokine production by mouse epidermal cells. *Folia Parasitol (Praha).* 51:367-72.

Peumans, W. J., van Damme, E. J. (1995). The role of lectins in plant defence. *Histochem J.* 27:253-71.

Pichu, S., Ribeiro, J. M., Mather, T. N. (2009). Purification and characterization of a novel salivary antimicrobial peptide from the tick, *Ixodes scapularis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 390:511-5.

Prevot, P. P., Adam, B., Boudjeltia, K. Z., Brossard, M., Lins, L., Cauchie, P., Brasseur, R., Vanhaeverbeek, M., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2006). Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *J Biol Chem.* 281:26361-9.

Prevot, P. P., Beschin, A., Lins, L., Beaufays, J., Grosjean, A., Bruys, L., Adam, B., Brossard, M., Brasseur, R., Zouaoui Boudjeltia, K., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2009). Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J.* 276:3235-46.

Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M. V., Kantor, F. S., Anderson, J. F., Koski, R. A., Fikrig, E. (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature.* 436:573-7.

Rand, K. N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G. S. (1989). Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:9657-61.

Rego, R. O., Hajdusek, O., Kovár, V., Kopáček, P., Grubhoffer, L., Hypsa, V. (2005). Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 35:991-1004.

Rego, R. O., Kovár, V., Kopáček, P., Weise, C., Man, P., Sauman, I., Grubhoffer, L. (2006). The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. *Insect Biochem Mol Biol.* 36:291-9.

Renard, G., Garcia, J. F., Cardoso, F. C., Richter, M. F., Sakanari, J. A., Ozaki, L. S., Termignoni, C., Masuda, A. (2000). Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochem Mol Biol.* 30:1017-26.

Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R., Spielman, A. (1985). Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med.* 161:332-44.

Ribeiro, J. M. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol.* 32:463-78.

Ribeiro, J. M., Endris, T. M., Endris, R. (1991). Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 100:109-12.

Ribeiro, J. M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis.* 4:143-52.

Ribeiro, J. M., Mather, T. N. (1998). *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Exp Parasitol.* 89:213-21.

Ribeiro, J. M., Alarcon-Chaidez, F., Francischetti, I. M., Mans, B. J., Mather, T. N., Valenzuela, J. G., Wikel, S. K. (2006). An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem Mol Biol.* 36:111-29.

Sá-Nunes, A., Bafica, A., Antonelli, L. R., Choi, E. Y., Francischetti, I. M., Andersen, J. F., Shi, G. P., Chavakis, T., Ribeiro, J. M., Kotsyfakis, M. (2009). The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *J Immunol.* 182:7422-9.

Ricci, C. G., Pinto, A. F., Berger, M., Termignoni, C. (2007). A thrombin inhibitor from the gut of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol.* 42:291-300.

Rudenko, N., Golovchenko, M., Edwards, M. J., Grubhoffer, L. (2005). Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *J Med Entomol.* 42:36-41.

Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. (2007). Gene organization of a novel defensin of *Ixodes ricinus*: first annotation of an intron/exon structure in a hard tick defensin gene and first evidence of the occurrence of two isoforms of one member of the arthropod defensin family. *Insect Mol Biol.* 16:501-7.

Saito, Y., Konnai, S., Yamada, S., Imamura, S., Nishikado, H., Ito, T., Onuma, M., Ohashi, K. (2009). Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Insect Mol Biol.* 18:531-9.

Sanders, M. L., Jaworski, D. C., Sanchez, J. L., DeFraités, R. F., Glass, G. E., Scott, A. L., Raha, S., Ritchie, B. C., Needham, G. R., Schwartz, B. S. (1998). Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 59:279-85.

Schoeler, G. B., Wikel, S.K. (2001). Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. *Ann Trop Med Parasitol.* 95:755-71.

Schuijt, T. J., Hovius, J. W., van Burgel, N. D., Ramamoorthi, N., Fikrig, E., van Dam, A. P. (2008). The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infect Immun.* 76:2888-94.

Seixas, A., Dos Santos, P. C., Velloso, F. F., Da Silva, Vaz. I. Jr., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C. (2003). A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology.* 126:155-63.

Simser, J. A., Macaluso, K. R., Mulenga, A., Azad, A. F. (2004). Immune-responsive lysozymes from hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* and an embryonic cell line of the Rocky Mountain wood tick, *D. andersoni*. *Insect Biochem Mol Biol.* 34:1235-46.

Silva, F. D., Rezende, C. A., Rossi, D. C., Esteves, E., Dyszy, F. H., Schreier, S., Gueiros-Filho, F., Campos, C. B., Pires, J.R., Daffre, S. (2009). Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J Biol Chem.*284:34735-46.

Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdusek, O., Caffrey, C. R., Mares, M., Kopáček, P. (2008). Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit Vectors.*1:7.

Sonenshine, D.E.(1991). *Biology of Ticks*, Vol. 1. Oxford university Press. New York.

Sonenshine, D.E. (1993). *Biology of ticks*. Vol. 2. Oxford University Press. New York.

Sonenshine, D. E., Hynes, W. L., Ceraul, S. M., Mitchell, R., Benzine, T. (2005). Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. *Exp Appl Acarol.* 36:207-23.

Sonenshine, D. E., Hynes, W. L. (2008). Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Front Biosci.* 13:7046-63.

Sorgine, M. H., Logullo, C., Zingali, R. B., Paiva-Silva, G. O., Juliano, L., Oliveira, P. L. (2000). A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem.* 275:28659-65.

Steen, N. A., Barker, S. C., Alewood, P.F. (2006). Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicon* 47:1-20.

Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Tsuda, A., Ohashi, K., Onuma, M. (2003). A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*;

cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine*. 21:2844-51.

Sukumaran, B., Narasimhan, S., Anderson, J. F., DePonte, K., Marcantonio, N., Krishnan, M. N., Fish, D., Telford, S. R., Kantor, F. S., Fikrig, E. (2006). An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. *J Exp Med*. 203:1507-17.

Tabish, M., Clegg, R. A., Turner, P. C., Jonczy, J., Rees, H. H., Fisher, M. J. (2006). Molecular characterisation of cAMP-dependent protein kinase (PK-A) catalytic subunit isoforms in the male tick, *Amblyomma hebraeum*. *Mol Biochem Parasitol*. 150:330-9.

Taylor, D.M. (2006). Innate Immunity in Ticks: A review. *J Acarol Soc Jpn*. 15: 109-127

Todd, S. M., Sonenshine, D. E., Hynes, W. L. (2007). Tissue and life-stage distribution of a defensin gene in the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Med Vet Entomol*. 21:141-7.

Tsuji, N., Kamio, T., Isobe, T., Fujisaki, K. (2001). Molecular characterization of a peroxiredoxin from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Mol Biol*. 10:121-9.

Tsuji, N., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J. H. Jr, Fujisaki, K. (2007). Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infect Immun*. 75:3633-40.

Tyson, K., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E., de Silva, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Mol Biol*. 16:469-79.

Tyson, K.R., Elkins, C., de Silva, A.M. (2008). A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin. *J Immunol*. 180(6):3964-8.

Umemiya, R., Hatta, T., Liao, M., Tanaka, M., Zhou, J., Inoue, N., Fujisaki, K. (2007). *Haemaphysalis longicornis*: molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks. *Exp Parasitol*. 115:135-42.

Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem*. 275:18717-23.

van de Locht, A., Stubbs, M. T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Höffken, W., Huber, R. (1996). The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO J*. 15:6011-7.

Wang, H., Nuttall, P. A. (1994). Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 109:525-30.

Wang, H., Nuttall, P. A. (1995). Immunoglobulin G binding proteins in male *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasite Immunol.* 17:517-24.

Wang, X., Coons, L. B., Taylor, D.B., Stevens, S. E. Jr., Gartner, T. K. (1996). Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *J Biol Chem.* 271:17785-90.

Wang, H., Nuttall, P. A. (1999). Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell Mol Life Sci.* 56:286-95.

Waxman, L., Smith, D. E., Arcuri, K. E., Vlasuk, G. P. (1990). Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science.* 248:593-6.

Waxman, L, Connolly, T.M. (1993). Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem.* 268:5445-9

Wikel, S. K. (1996). Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol.* 41:1-22.

Yamaji, K., Tsuji, N., Miyoshi, T., Islam, M. K., Hatta, T., Alim, M. A., Anisuzzaman, Takenaka, A., Fujisaki, K. (2009). Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol Int.* 58:232-7.

Yamaji, K., Tsuji, N., Miyoshi, T., Hatta, T., Alim, M. A., Anisuzzaman, Kushibiki, S., Fujisaki, K. (2010). Hlcyst-1 and Hlcyst-2 are potential inhibitors of HICPL-A in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Vet Med Sci.* 72:599-604.

Yu, D., Liang, J., Yu, H., Wu, H., Xu, C., Liu, J., Lai, R. (2006)a. A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 343:585-90.

Yu, D., Sheng, Z., Xu, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Rees, H. H., Lai, R. (2006)b. A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Peptides.* 27:31-5.

Zeidner, N. S., Schneider, B. S., Nuncio, M. S., Gern L, Piesman, J. (2002). Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *J Parasitol.* 88:1276-8.

Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Xuan, X., Fujisaki, K. (2006). A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol.* 36:527-35.

Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X., Fujisaki, K. (2007). Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides.* 28:1304-10.

Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X., Fujisaki, K. (2009). Characterization of an intracellular cystatin homolog from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Vet Parasitol.* 160:180-3.

Zhou, J., Liao, M., Gong, H., Xuan, X., Fujisaki, K. (2010). Characterization of Hlcyst-3 as a member of cystatins from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Exp Appl Acarol.* 51:327-33.

Zhu K, Bowman AS, Brigham DL, Essenberg RC, Dillwith JW, Sauer JR. (1997). Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Exp Parasitol.* 87:30-8.